



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea in Farmacia

TITOLO

**Il riposizionamento farmaci:
stato dell'arte e prospettive future**

Relatore:
Chiar.^{ma} Prof.^{ssa} Paola Fossa

Candidato:
Gianluca Collina

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

Riassunto	pag. 3
1. Storia del riposizionamento farmaci	pag. 5
2. Approcci utilizzati per il riposizionamento farmaci	pag. 8
3. La chiave del riposizionamento farmaci: i database	pag. 17
4. Riposizionamento farmaci in varie patologie	pag. 32
5. Riposizionamento farmaci per Covid-19	pag. 47
6. Conclusioni	pag. 59
7. Bibliografia	pag. 60

Riassunto

Il processo di scoperta che porta all'immissione in commercio di un nuovo potenziale farmaco richiede molto tempo. Lo sviluppo e l'approvazione di un principio attivo può richiedere dai 10 ai 15 anni. Si stima che le aziende farmaceutiche spendano quasi 1,2 miliardi di dollari per portare un nuovo farmaco sul mercato, questa cifra può raggiungere anche i 2-3 miliardi di dollari per una singola molecola. È stato calcolato che nei primi anni '90 l'industria farmaceutica spendeva circa 16 miliardi di dollari all'anno in Ricerca e Sviluppo (R&S). Questa cifra è salita a circa 40 miliardi di dollari nel decennio successivo e si prevede supererà i 100 miliardi di dollari nel prossimo futuro. Considerando l'aumento degli investimenti recentemente effettuato nello sviluppo di farmaci, va notato che fra il 2014 e il 2016 sono stati approvati solo 22 nuovi farmaci, numero drasticamente inferiore rispetto ai 53 farmaci approvati due decenni fa. Quindi, in relazione all'aumento delle spese e degli investimenti, il numero di nuovi farmaci che arrivano sul mercato è molto inferiore. Ciò deriva dal fatto che le sfide che l'industria farmaceutica globale deve affrontare sono molteplici e comprendono elevate percentuali di fallimento, tempi più lunghi per l'immissione sul mercato di nuovi farmaci in alcune aree terapeutiche e requisiti normativi in evoluzione; tutti elementi che possono contribuire ad aumentare i costi. È stato stimato che l'aumento dei costi e dei tempi necessari per lo sviluppo di nuovi farmaci determina, in media, per ogni dollaro speso in R&S un guadagno di meno di un dollaro, fatto che potrebbe rendere in futuro l'industria farmaceutica una scelta poco attrattiva per gli investitori. L'approvazione di un farmaco per uso umano necessita un lungo processo di ricerca che presuppone di identificare e sottoporre a molteplici valutazioni precliniche circa 5000 composti; tra questi in media solo 5 sono selezionati per un ulteriore sviluppo clinico, che dopo anni di valutazioni cliniche porterà all'approvazione del farmaco.

Nel maggio del 2012, il National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) un istituto del National Institute of Health negli Stati Uniti d'America, ha introdotto il programma "Discovery of New Therapeutic Uses for Existing Molecules" per individuare nuove indicazioni terapeutiche per i farmaci esistenti: i farmaci attualmente in sviluppo clinico e i farmaci ritirati o sospesi. Questo approccio è noto con il nome di drug-repositioning, letteralmente traducibile come "riposizionamento del farmaco". Il NCATS ha definito il repositioning come: *"studying the drugs that are already approved to treat one disease or condition to see if they*

are safe and effective for treating other diseases”, ovvero lo studiare farmaci già approvati per trattare un'altra patologia o condizione, per valutare se sono sicuri ed efficaci per trattare una nuova patologia. La strategia consiste nell'identificare nuovi usi per farmaci approvati o in fase di sperimentazione che non rientrano nell'ambito dell'indicazione medica originale. Questa strategia offre diversi vantaggi rispetto allo sviluppo di un farmaco completamente nuovo. In primo luogo, il rischio di fallimento è più basso, poiché il farmaco riposizionato è già stato trovato sufficientemente sicuro in modelli animali preclinici e anche in modelli umani (se è stata completata la Fase III della sperimentazione clinica). Di conseguenza è meno probabile che, almeno da un punto di vista della sicurezza, il progetto di ricerca fallisca. In secondo luogo, i tempi di sviluppo del farmaco possono essere ridotti, poiché la maggior parte dei test preclinici, relativi alla valutazione della sicurezza e, in alcuni casi, allo sviluppo della formulazione, sono già stati completati. In terzo luogo, sono sicuramente necessari meno investimenti, anche se questo aspetto varia notevolmente a seconda della fase e del processo di sviluppo raggiunto dal farmaco candidato. I costi di regolamentazione e di Fase III possono rimanere più o meno gli stessi per un farmaco riposizionato, ma possono esserci notevoli risparmi nei costi degli studi preclinici, nella Fase I e nella Fase II della sperimentazione clinica. Tutti questi vantaggi consentono quindi di affrontare un investimento meno rischioso e più rapido nello sviluppo di farmaci, con costi mediamente più bassi una volta che i fallimenti sono stati contabilizzati. Di norma, i costi per riposizionare un farmaco su un nuovo bersaglio terapeutico sono stati stimati essere in media 300 milioni di dollari, rispetto ai circa 2-3 miliardi di dollari necessari per sviluppare una nuova entità chimica.

Il riposizionamento dei farmaci è quindi un approccio promettente che viene applicato dalle industrie farmaceutiche principalmente per individuare farmaci adatti al trattamento di malattie genetiche rare, ma sta riscuotendo un crescente interesse anche da parte degli enti governativi e della comunità accademica, come attestato dagli studi pubblicati in letteratura. Il suo impiego è sicuramente dovuto anche al supporto dato dalla chemioinformatica e dalla bioinformatica nella gestione di grandi quantità di dati.

Circa il 10% dei farmaci derivati da riposizionamento è stato già approvato dai rispettivi enti regolamentatori e il 70% si trova in varie fasi di sviluppo clinico.

Storia del riposizionamento farmaci

Storicamente, il riposizionamento dei farmaci è avvenuto in gran parte in maniera casuale (serendipity). Infatti, una volta osservato in un farmaco un effetto off-target o individuati nuovi effetti on-target, il suo sviluppo è stato portato avanti per lo sfruttamento commerciale. Gli esempi più riusciti di riposizionamento fino ad oggi non hanno comportato un approccio sistematico di ricerca. Gli esempi più famosi sono dati dal sildenafil e dalla talidomide, ma in letteratura ne sono descritti molti altri.

Il sildenafil, originariamente sviluppato come farmaco antiipertensivo, nel 2000 è stato riconvertito da Pfizer per il trattamento della disfunzione erettile basandosi su un'analisi clinica retrospettiva ed è stato commercializzato come Viagra. Le vendite del prodotto, in crescita costante negli anni successivi, lo hanno portato a detenere nel 2012 una quota del mercato dei farmaci per la disfunzione erettile del 47%, per un totale di circa 2,05 miliardi di dollari di fatturato.

La talidomide, un sedativo a struttura imidica originariamente commercializzato come sedativo e ipnoinducente, nonché per la nausea mattutina nelle donne in gravidanza, è stato ritirato nei primi anni 60 a causa dei suoi gravissimi effetti collaterali se assunto in gravidanza. Tuttavia, studi negli anni successivi hanno mostrato che il farmaco è efficace nel trattamento sull'eritema nodoso leproso (1964) e molto più recentemente, dalla fine degli anni 90, nella terapia del mieloma multiplo. A seguito di queste ricerche, la talidomide ha avuto un notevole successo commerciale per il trattamento mieloma multiplo e sono stati sviluppati ed approvati dei derivati ancora più efficaci, come il Lenalidomide (Revlimid® commercializzato dalla Celgene Corporation), che nel 2017 ha avuto un fatturato globale di 8,2 miliardi di dollari.

Un altro esempio storico di farmaco riposizionato è rappresentato dal minoxidil, approvato dalla FDA nel 1979 come antipertensivo, è stato riposizionato come farmaco per combattere l'alopecia androgenetica nel 1988. L'accrescimento di capelli e peli di tale farmaco venne scoperto fin dai primi studi clinici dalla azienda farmaceutica statunitense Upjohn, che classificò il fatto come un effetto collaterale innocuo. Una volta arrivato sul mercato, si scoprì che il farmaco aveva un effetto stimolante sulla crescita dei capelli, come affermato da Anthony Chu, professore di dermatologia all'Università di Buckingham, "Il minoxidil favorisce una crescita ragionevole dei capelli nel 40% degli utilizzatori, mentre a un altro 40% impedisce l'ulteriore perdita, risultando inefficace solo nel 20% dei casi". Solo nel 1978 la Upjohn ha

iniziato le sperimentazioni cliniche della formulazione topica, per arrivare nel 1988 a lanciare il minoxidil soluzione topica 2% per il trattamento di calvizie maschili. Due anni dopo, la licenza del farmaco è stata allargata anche alle donne che presentavano perdita di capelli, per diventare negli anni successivi un farmaco da banco.

La storia del metotrexato risale al 1948 con il primo rapporto di Sidney Farber che mostrava l'efficacia dell'aminopterin, un antagonista dell'acido folico, nel trattamento della leucemia infantile, proponendo così l'uso di antimetaboliti nel trattamento di questa patologia. Uno degli effetti osservati per l'aminopterin è stata la sua interferenza nella proliferazione del tessuto connettivo. Questa osservazione ha portato nel 1951 ad uno studio di Gubner et al. sull'artrite reumatoide. Gli autori hanno somministrato l'aminopterin a diversi pazienti con artrite reumatoide, psoriasi e artrite psoriasica. In sei dei sette pazienti che hanno ricevuto l'aminopterin si è verificato un rapido miglioramento dei segni e dei sintomi di artrite reumatoide. È stato notato che la psoriasi è stata curata in un paziente che aveva "artrite reumatoide e psoriasi". Questo ha portato gli autori ad ampliare il loro studio, con buoni risultati. È stato osservato un miglioramento nella malattia della pelle e delle articolazioni entro diverse settimane di trattamento, tuttavia, sono stati osservati effetti collaterali. Ulteriori studi negli anni successivi hanno portato nel 1988 la FDA ad approvare il metotrexato per il trattamento della artrite reumatoide, portandolo ad essere ad oggi uno dei farmaci più prescritti.

La Tabella 1 mostra altri esempi di successo e agli approcci di riposizionamento utilizzati. La maggior parte di questi riposizionamenti sono derivati da una maggiore comprensione della farmacologia del farmaco o da analisi retrospettive dell'effetto clinico del farmaco, quando prescritto per la sua indicazione originale.

Tali successi hanno anche incoraggiato la nascita di molte nuove aziende focalizzate sulla tecnica del riposizionamento e sullo sviluppo di approcci più sistematici per identificare i composti riposizionabili. Questi approcci hanno portato all'identificazione di un certo numero di farmaci promettenti, alcuni dei quali sono in fase avanzata di studio clinico, con la prospettiva di essere inseriti nel trattamento terapeutico di malattie comuni e rare, per le quali il riposizionamento è una strategia importante per lo sviluppo di un farmaco adatto.

Nonostante questi risultati positivi, rimangono ancora svariati aspetti di tipo tecnico, normativo e organizzativo da definire, per consentire un ulteriore progresso del riposizionamento di farmaci.

Tabella 1. Esempi di riposizionamento di farmaci

Farmaco	Indicazione originale	Nuova indicazione	Data approvazione	Commento sul risultato del riposizionamento del farmaco
Aspirina	Analgesia	Cancro colon rettale	2015	Nel settembre 2015 la US Preventive Services Task Force ha rilasciato una bozza di indicazione dell'uso di aspirina per aiutare a prevenire il cancro coloretale
Atomoxetina	Parkison	ADHD	2002	Nel 2016 Stratterra® (Eli Lilly) registra un totale di vendite pari a 855 milioni di dollari
Azidotimidina	Cancro	HIV/AIDS	1987	L'azidotimidina è stato il primo farmaco anti-HIV approvato dalla FDA
Bromocriptina	Parkison	Diabete mellito		
Bupropione	Depressione	Cessazione del fumo		
Celecoxib	Dolore e infiammazione	Poliposi adenomatosa familiare	2000	A fine 2014 il fatturato totale di Celebrex® (Pfizer) è stato di 2,69 miliardi di dollari
Dapoxetina	Analgesia e depressione	Eiaculazione precoce	2012	Approvato nel Regno Unito e in alcuni paesi europei, in attesa di approvazione negli Stati Uniti. Si prevedono picchi di vendita di 750 milioni di dollari
Duloxetina	Depressione	Incontinenza urinaria da stress (SUI)	2004	Approvato dall'EMA per la SUI, mentre questa nuova applicazione è stata ritirata negli USA.
Finasteride	Iperplasia prostatica benigna	Perdita di capelli		
Gabapentin	Epilessia	Dolore neuropatico		
Ketoconazolo	Infezione fungina	Sindrome di Cushing	2014	Approvato dall'EMA per la sindrome di Cushing in adulti e adolescenti maggiori di 12 anni
Metotrexato	Cancro	Artrite reumatoide	1988	La nuova applicazione lo porta ad essere uno dei farmaci più prescritti negli USA
Minoxidil	Iperensione	Perdita di capelli	1988	Nel 2016 le vendite di minoxidil ammontano a 860 milioni di dollari
Propranololo	Iperensione	Eemicrania		
Raloxifene	Osteoporosi	Tumore alla mammella	2007	Approvato dall'EMA per il cancro alla mammella invasivo. Nel 2016 le vendite hanno raggiunto i 237 milioni di dollari
Rituximab	Diverse tipologie di cancro	Artrite reumatoide	2006	Nel 2015 le vendite hanno raggiunto i 7 miliardi di dollari
Sildenafil	Angina	Disfunzione erettile	1998	Commercializzato come Viagra® (Pfizer), il sildenafil è diventato leader nel mercato dei farmaci per la disfunzione erettile, con vendite globali pari a 2,05 miliardi di dollari nel 2012
Talidomide	Nausea mattutina	Eritema nodoso leproso e mieloma multiplo	1998 e 2006	I derivati della talidomide hanno ottenuto un notevole successo clinico e commerciale nel mieloma multiplo
Topiramato	Epilessia	Obesità	2012	Qsymia® (Vivus) contiene topiramato in combinazione con fentermina

1. Approcci utilizzati per il riposizionamento farmaci

In genere, prima di procedere allo sviluppo, una strategia di riposizionamento farmaci è costituita da tre fasi: identificazione di una molecola candidata a una determinata indicazione; valutazione meccanicistica dell'effetto del farmaco in modelli preclinici; valutazione dell'efficacia nella Fase II della sperimentazione clinica (supponendo che vi siano sufficienti dati di sicurezza provenienti da studi di Fase I). Di queste tre fasi, la prima (l'identificazione del farmaco più appropriato per ottenere indicazioni con un alto livello di confidenza) è fondamentale, ed è qui che si possono inserire gli approcci recenti per la generazione di ipotesi. Esistono vari approcci per affrontare il problema, come quelli in silico, biologici, sperimentali, misti e basati sulla conoscenza delle caratteristiche del problema.

In silico

Con questo metodo vengono utilizzate varie banche dati pubbliche e raccolte informazioni da ricerche, studi clinici, relazioni sulle indicazioni e altri dati pubblicati. Successivamente, applicando metodi bioinformatici vengono identificati i network di interazione tra il target ed i farmaci. Ci sono vari database disponibili sulle patologie, sulle proteine bersaglio e sui farmaci, quali ChemBank, DrugBank, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, Pubmed, Online Mendelian Inheritance in Animals, Protein Data Bank, GenBank, Gene Expression Omnibus, Mammalian protein-protein interaction database.

Questa mole di dati supporta lo sviluppo di vari approcci computazionali, che risultano essere efficaci per quanto riguarda i costi e gli ostacoli da superare. Gli approcci in silico si basano infatti sull'analisi e sull'integrazione sinergica di una pletora di informazioni sulla relazione tra farmaco e patologia e sull'analisi dell'espressione genica dopo trattamento farmacologico delle linee cellulari rilevanti. Tale approccio può essere sviluppato attraverso differenti strategie, quale l'uso di network biologici e text-mining, per citarne alcuni che verranno di seguito approfonditi.

Text-mining approach

Oltre a molte informazioni sullo sviluppo dei farmaci è possibile ricavare dalle pubblicazioni numerosi dati sulle relazioni di tipo biologico. Molti di questi dati sono di recente pubblicazione e grazie a risorse informatiche, il text mining può essere impiegato per estrarre

le informazioni utili e identificare connessioni o relazioni farmaco-target lavorando su molteplici pubblicazioni. Il text mining in biologia ad esempio include il recupero di informazioni rilevanti dalla letteratura; il riconoscimento di entità di nomi biologici con l'uso di vocaboli corretti; informazioni biologiche e l'ottenimento quindi di nuove nozioni grazie all'analisi effettuata. Possono essere approfondite le relazioni tra il target e il farmaco o la patologia e il farmaco. Le tecniche di elaborazione del linguaggio aumentano lo sviluppo di strumenti per il text mining e aiutano a individuare farmaci riposizionabili.

Cluster approaches

Gli approcci di clustering sono ottimali per identificare nuove relazioni tra il target e il farmaco o tra la patologia e il farmaco. Si basano sul concetto che le entità biologicamente attive (farmaci, proteine) e il loro network hanno caratteri analoghi. Usando algoritmi di cluster si possono identificare diversi gruppi di oggetti che mostrano le stesse interazioni, es. farmaco-farmaco, farmaco-target, farmaco-patologia. I software CLIQUE, DBSCAN, OPTICS, STING sono utilizzati in questo ambito.

Propagation approach

Questo metodo può essere utile per scoprire le interazioni tra la patologia e i geni, tra patologia e patologia e tra il target e patologia. Si basa sul concetto che le informazioni vengono trasmesse dal nodo centrale del network agli internodi, fino ai vari sottonodi. Si differenziano in approcci locali e globali. Gli approcci locali estraggono piccole informazioni dalla rete, quindi la previsione potrebbe non avere successo in alcuni casi, mentre gli approcci globali estraggono dati da una rete completa e attualmente sono considerati i migliori e i più interessanti.

Semantic approach

È ampiamente applicato per estrarre informazioni e immagini che possono essere utilizzato ai fini del riposizionamento. Le relazioni tra entità biologiche sono estrapolate da database medici e viene costruita una rete semantica basata su una rete ontologica esistente, inoltre vengono sviluppati algoritmi per evidenziare le interazioni presenti all'interno del network.

Databases e resources

I progressi delle biotecnologie, della bioinformatica e delle tecniche -omiche (proteomica, genomica, metabolomica, ecc.) hanno portato allo sviluppo di diverse banche dati in biologia, chimica, medicina e farmacologia. Queste banche dati possono essere utilizzate per il riposizionamento di farmaci. Un elenco delle varie risorse è riportato nella Tabella 3.

Le banche dati di farmaci come DrugBank, Drug versus Disease, Drug Combination Database, Collaborative Drug Discovery, DrugMap central, network medicine, Pharmacogenomics Knowledge Base sono molto importanti per il riposizionamento. Essi contengono dati riguardanti le proprietà dei farmaci, l'interazione tra entità biologiche e farmacologiche oppure consentono l'uso di vari strumenti di calcolo.

I database chimici come ChEMBL, Chem2-Bio2RDF, ChemDB, PubChem forniscono dati sulle strutture chimiche, impronte digitali topologiche 2D e conformazioni 3D. Partendo da composti con strutture simili possono contribuire a prevedere e individuare nuove strutture di farmaci con nuove indicazioni e possono permettere di costruire network chimici fra le strutture. PubChem è uno di quelli più utilizzati per le strutture chimiche.

I database di proteomica come Mammalian protein-protein interaction database (MIPS), Protein Data Bank, human proteinpedia e Human Protein Reference Database esplorano le interazioni tra le proteine e possono essere utilizzati per il riposizionamento di farmaci basato su network. Si possono costruire reti eterogenee come la rete farmaco-proteina-malattia. MIPS è uno dei database più conosciuti e utilizzati

L'analisi di un'enorme quantità di letteratura è essenziale per il riposizionamento dei farmaci, quindi anche i database della letteratura medica sono importanti. PubMed è il più utilizzato, dal momento che contiene un'enorme quantità di dati con oltre 27 milioni di citazioni. L'uso corretto dei dati per l'estrapolazione di nuove informazioni è ancora in evoluzione. Diversi algoritmi di machine learning insieme ad approcci computazionali e sperimentali possono migliorare il potenziale di riposizionamento di un farmaco.

Biological approach

La biologia dei sistemi e il suo network aiutano la scoperta di farmaci attraverso lo sviluppo di vari modelli che simulano l'ambiente fisiologico delle proteine bersaglio e ciò che accade a

seguito della loro modulazione. Questo è un approccio chiave per la lotta contro le malattie complesse multifattoriali. L'approccio di biologia dei sistemi è utile anche perché modula intere vie metaboliche invece di una singola proteina bersaglio. Nella biologia dei sistemi, i modelli vengono sviluppati comprendendo le vie metaboliche, senza perdere i dettagli chiave. Questo approccio multi-target sta acquisendo importanza anche per colpire malattie complesse. L'utilizzo e l'influenza della biologia dei sistemi nel riposizionamento e nel processo di sviluppo degli stessi sarà aumentato in futuro dalla possibilità di realizzare mappe di interazione disegnate sulle vie metaboliche patologiche e di valutare gli effetti della modulazione di varie proteine bersaglio in modelli di organismi.

Experimental approach

Si tratta di metodi basati sulla sperimentazione che includono lo screening dei target, il test cellulare, il modello animale e gli aspetti clinici.

Mixed approach

Gli approcci misti consentono di integrare l'osservazione computazionale, gli esperimenti biologici e i test clinici e risultano essere molto efficaci per il riposizionamento di farmaci. Esiste un numero enorme di malattie che ha bisogno di nuovi farmaci per il suo trattamento. Persino nel caso di malattie rare, oltre 6.000 sono ancora da esplorare e la ricerca è limitata al solo 5% di esse.

Knowledge approach

Il riposizionamento di farmaci può basarsi sulle conoscenze dei ricercatori e dei medici e sulla loro capacità di interpretare i dati disponibili. Alcuni casi sono dovuti alla serendipity, mentre in altri il risultato di riposizionamento è stato ottenuto per merito della ricerca. I primi casi di riposizionamento, come già scritto in questa tesi, si sono verificati principalmente grazie alla serendipity, mentre successivamente, studiando condizioni di patologia simili, che condividono vie metaboliche mutate, si è scoperto che un farmaco poteva essere utilizzato anche per patologie diverse da quella originale per cui era stato sviluppato.

Signature matching

Il signature matching si basa sul confronto tra i profili unici, detti signature (letteralmente firma), di un farmaco e quelli di un altro farmaco, patologia o fenotipo clinico. La signature di un farmaco può essere derivato da tre tipi generali di dati: trascrittomici (RNA), proteomici o metabolomici; strutture chimiche; o profili di effetti avversi. Le signature trascrittomiche corrispondenti possono essere utilizzate per collegare un farmaco con una patologia o fare collegamenti tra farmaci.

Nel primo caso, il profilo trascrittomico di un particolare farmaco è ottenuto confrontando l'espressione genica di materiale biologico, come ad esempio una cellula o un tessuto, prima e dopo il trattamento con il farmaco; il differenziale dei profili di espressione genica determina la signature molecolare del farmaco ed è quindi confrontata con un profilo di espressione associato alla malattia che è stato ottenuto in modo simile attraverso l'analisi del differenziale tra le espressioni geniche della malattia rispetto alle condizioni di salute. Il grado della correlazione negativa tra l'espressione genica del farmaco e quella della malattia (cioè, i geni upregolati dalla malattia vengono downregolati con il farmaco e viceversa) permetterebbe quindi di dedurre se il farmaco può avere un effetto potenziale sulla patologia. Questo approccio si basa sul principio della reversibilità della signature, nel quale si presume che se un farmaco può invertire il modello di espressione di un certo insieme di geni che sono la caratteristica di un determinato fenotipo di patologia (cioè, la signature del farmaco sarà più prossima a quella ottenuta per lo stato di salute), allora quel farmaco potrebbe essere in grado di ripristinare il fenotipo corretto rispetto a quello malato. Nonostante questo principio sia abbastanza semplicistico, è stato validato per i disturbi metabolici ed è stato successivamente sfruttato positivamente per identificare nuove opportunità di riposizionamento di farmaci in un'ampia gamma di aree terapeutiche. La reversibilità della signature è stata anche utilizzata con successo per identificare i farmaci basati su firme di resistenza da riposizionare come chemio-sensibilizzanti nell'ambito dei farmaci anticancro.

Gli approcci che studiano la somiglianza tra farmaci hanno lo scopo di identificare meccanismi d'azione condivisi di farmaci differenti (per esempio farmaci che appartengono a classi diverse o che sono strutturalmente dissimili). Questo principio è chiamato guilty by association (colpevolezza per associazione) e può aiutare l'identificazione di target alternativi di farmaci esistenti e scoprire potenziali effetti off-target che possono essere studiati per applicazioni

cliniche. Una signature transcriptomica condivisa tra due farmaci potrebbe quindi implicare che questi condividono anche un'applicazione terapeutica, indipendentemente dalla somiglianza o dalle differenze delle loro strutture chimiche. Questo principio si è dimostrato efficace anche quando sono state confrontate firme trascrizionali che riflettevano un meccanismo d'azione secondario, che poteva essere condiviso da gruppi di farmaci distinti.

Sia gli studi per la somiglianza tra farmaco e patologia che quello per la somiglianza tra farmaci implicano il confronto di signature trascrittomiche e quindi si basano in larga misura su dati di espressione genica accessibili da banche dati pubbliche. La Connectivity Map (cMap), creata nel 2006 dal Broad Institute, ad oggi, ha prodotto una libreria contenente oltre 1,5 milioni profili di espressione genica, da ~5.000 composti di piccole molecole e ~3.000 reagenti genetici. La cMap data repository (cMap 3.0) è ora disponibile presso la National Institutes of Health (NIH) Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS). Comprende la trascrizione di signature cellulari generati con decine di migliaia di composti studiate su centinaia di linee cellulari umane. Questa enorme risorsa può essere utilizzata insieme ad altri importanti archivi pubblici di dati trascrittomici, come il Gene Expression Omnibus e Array Express, che contengono dati grezzi di espressione genica di centinaia di patologie in modelli umani e animali. Manualmente o tramite strumenti computazionali dedicati si può quindi utilizzare il sistema, in associazione con i dati cMap, per identificare nuove connessioni tra farmaco e patologia e scoprire potenziali opportunità di riposizionamento dei farmaci.

Il secondo tipo di signature matching usato nel riposizionamento utilizza le strutture chimiche mettendole in relazione all'attività biologica; si confronta la signature di un farmaco con quella di un altro per osservare dei punti di similarità che possono suggerire un'attività biologica condivisa. Il processo comporta la selezione di un insieme di caratteristiche chimiche per ogni farmaco e la costruzione di network basato sulle caratteristiche chimiche comuni.

Keiser e il suo gruppo di lavoro si è mosso in questa direzione pubblicando uno studio chemioinformatico che ha avuto come obiettivo quello di prevedere nuovi target per 878 farmaci di piccole dimensioni e 2.787 composti farmaceutici già approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). Utilizzando un approccio di similarity ensemble (SEA) hanno valutato la somiglianza strutturale 2D di ciascun farmaco al gruppo di leganti di ciascun target, riuscendo a identificare 23 nuove associazioni farmaco e target. Questi studi sulla somiglianza delle

strutture chimiche presentano alcuni aspetti negativi: errori nelle strutture chimiche o effetti fisiologici che si verificano al di là della semplice relazione strutturale (ad esempio, la molecola attiva potrebbe essere un metabolita del farmaco originale con la struttura modificata) potrebbero limitare l'uso di questo approccio nel riposizionamento di farmaci.

Infine, la terza tipologia prevede che ogni farmaco abbia un profilo di effetti negativi relativamente unico che potrebbe essere usato come metodo di confronto tra farmaci (concetto del *proxy*), partendo dal presupposto che l'analogo effetto avverso di due farmaci possa essere dovuto alla loro azione sullo stesso target, su una proteina condivisa o sulla stessa via metabolica. È anche possibile che il fenotipo dell'effetto avverso di un particolare farmaco possa assomigliare a quello di una malattia; questo suggerirebbe vie metaboliche e fisiologia condivisi sia dal farmaco che dalla malattia. Il gruppo di Peer Bork ha utilizzato questa teoria per identificare nuove interazioni tra farmaco e target per 746 farmaci approvati. Per effettuare questo studio, è stata usata l'ontologia dell'Unified Medical Language System (UMLS) per quanto riguarda i sintomi medici e gli effetti avversi rilevanti sono stati estrapolati dai foglietti illustrativi delle confezioni dei farmaci. Queste informazioni sono state ponderate in base alla frequenza con cui si manifestavano e i farmaci sono stati valutati effettuando simulazioni di effetti avversi. Questo studio, non solo ha confermato coppie di farmaci precedentemente note che condividevano lo stesso target proteico, ma ha anche identificato nuovi target condivisi per 754 nuove coppie di farmaci. Una metodologia diversa è stata utilizzata da Yang e Agrawal per mettere in relazione tra loro gli effetti avversi dei farmaci con la patologia; essi hanno combinato le informazioni sugli effetti avversi derivanti dai foglietti illustrativi dei farmaci con le relazioni farmaco-patologia ottenute dal database PharmGKB e sono stati in grado di prevedere indicazioni di riposizionamento per 145 patologie.

Attualmente la limitazione di questa metodologia è data dalla difficoltà di ottenere informazioni sugli effetti avversi contenuti nei foglietti illustrativi e la mancanza di profili di effetti avversi ben definiti. Tuttavia, le tecniche di intelligenza artificiale che sfruttano il text mining e l'elaborazione del linguaggio naturale (NLP) sono sicuramente utili strumenti che verranno applicati in futuro per superare questi limiti.

Tabella 2. Lista varie fonti utili al riposizionamento

	Fonte	Metodo	Sito web
1	Pubmed	Text Mining Approach	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
2	Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA)	Text Mining Approach	https://omia.org/home/
3	Drugbank	Pharmacological databases	http://www.drugbank.ca/
4	Drug versus Disease (DvD)	Pharmacological databases	www.ebi.ac.uk/saezrodriguez/dvd
5	Drug Combination Database (DCDB)	Pharmacological databases	http://www.cls.zju.edu.cn/dcdb
6	Drug Map Central (DMC)	Pharmacological databases	http://r2d2drug.org/index.html
7	Side Effect Resource (SIDER)	Pharmacological databases	http://sideeffects.embl.de
8	DailyMed (US FDA)	Medical database	http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/about.cfm
9	Drugs@FDA Database	Medical database	http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/
10	FAERS (US FDA)	Medical database	http://www.fda.gov/Drugs/
11	FDALABEL (US FDA)	Medical database	https://labels.fda.gov/
12	ChemBank	Chemical databases	http://chembank.broad.harvard.edu
13	ChEMBL	Chemical databases	https://www.ebi.ac.uk/chembl/
14	ChemDB	Chemical databases	http://www.chemdb.com (servizio inattivo)
15	ChemDB	Chemical databases	http://www.chemdb.com
16	PubChem	Chemical databases	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
17	BindingDB	Chemical databases	http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp
18	ChemFrog	Chemical databases	http://www.chemfrog.com (servizio inattivo)
19	Chemicalize (ChemAxon)	Chemical databases	http://www.chemicalize.org
20	ChemSpider	Chemical databases	http://www.chemspider.com
21	Protein Data Bank (PDB)	Proteomics databases	http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do
22	Database of Interacting Proteins (DIP)	Proteomics databases	http://dip.doe-mbi.ucla.edu/dip/Main.cgi
23	Human Protein Reference Database (HPRD)	Proteomics databases	http://www.hprd.org/
24	IntAct Molecular Interaction Database	Proteomics databases	http://www.ebi.ac.uk/intact/
25	OCA	Proteomics databases	http://oca.weizmann.ac.il/oca-bin/ocamain
26	Sequence Read Archive (SRA)	Proteomics databases	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/
27	OncoPrint	Genomics database	https://www.oncoPrint.org
28	Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)	Genomics database	http://www.omim.org
29	Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB)	Genomics database	http://www.pharmgkb.org
30	ArrayExpress	Genomics database	http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/
31	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	Genomics database	http://www.genome.jp/kegg
32	CellMiner	Genomics database	http://discover.nci.nih.gov/cellminer/
33	Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID)	Genomics database	http://david.abcc.ncifcrf.gov
34	DbSNP	Genomics database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
35	Gene Expression Atlas	Genomics database	http://www.ebi.ac.uk/gxa
36	Gene Expression Omnibus (GEO)	Genomics database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo
37	Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)	Genomics database	http://www.broadinstitute.org/gsea
38	GeneCards Databases	Genomics database	http://www.genecards.org/
39	International Cancer Genome Consortium	Genomics database	https://icgc.org
40	Molecular Signature Database (MsigDB)	Genomics database	http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb
41	Mammalian protein-protein interaction database (MIPS)	Heterogenous networks	http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/ppi/
42	Search tool for interactions of chemicals (STRING)	Biological database e Proteomics databases	http://string-db.org/

43	Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID)	Biological database	http://thebiogrid.org/
44	Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)	Biological database	http://www.broadinstitute.org/ccle
45	GPCR-Ligand Database (GLIDA)	Biological approach	http://pharminfo.pharm.kyoto-u.ac.jp/services/glida/
46	NCI Pathway Interaction Database (NCI-PID)	Biological approaches	http://pid.nci.nih.gov/ (servizio inattivo)
47	OPM (membrane proteins)	Biological approaches	http://opm.phar.umich.edu
48	Pathway Commons	Biological approaches	http://www.pathwaycommons.org/about/
49	Psychoactive Drug Screening Program Ki (PDSP Ki)	Biological approaches	https://pdspdb.unc.edu/pdspWeb/
50	Reactome	Biological approaches	http://www.reactome.org
51	Human Metabolome Database (HMDB)	Metabolomics databases	http://www.hmdb.ca
52	Clinicaltrial.gov	Experimental approaches	http://clinicaltrials.gov
53	Library of Integrated Network based Cellular Signatures (LINCS)	Experimental approaches	http://www.lincsproject.org
54	NCGC Database	Experimental approaches	https://tripod.nih.gov/npc/
55	Princeton University MicroArray database (PUMAdb)	Experimental approaches	http://puma.princeton.edu
56	Stanford Microarray Database	Experimental approaches	http://smd.princeton.edu (servizio inattivo)
57	Collaborative Drug Discovery Vault	Mixed approaches	https://www.collaborativedrug.com
58	STITCH (Chemical-Protein Interactions)	Mixed approaches	http://stitch.embl.de/
59	SWEETLEAD	Mixed approaches	https://simtk.org/home/sweetlead
60	The Cancer Genome Atlas (TCGA)	Mixed approaches	http://cancergenome.nih.gov
61	The Connectivity Map (CMap)	Mixed approaches	http://www.broadinstitute.org/cmap
62	The NCGC Pharmaceutical Collection (NPC)	Mixed approaches	http://tripod.nih.gov/npc/
63	TOPSAN	Mixed approaches	http://www.topsan.org (servizio inattivo)
64	DistilBio	Knowledge based approach	http://distilbio.com
65	Proteopedia	Knowledge based repurposing	http://proteopedia.org
66	Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB)	Knowledge based approach	http://www.pharmgkb.org
67	Therapeutic Target Database (TTD)	Knowledge based approach	http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/

2. La chiave del riposizionamento farmaci: i database

I metodi di docking molecolare sono stati sfruttati per indagare come un farmaco e un bersaglio possono legarsi l'uno all'altro e quanta energia possiede il complesso. A tal fine, sono state sviluppate diverse applicazioni software. Nei metodi di data mining si scoprono relazioni nascoste tra farmaci e bersagli. Di conseguenza, le informazioni acquisite vengono utilizzate per la scoperta di farmaci che possono colpire un particolare bersaglio biologico. Queste tecniche sono solitamente suddivise in tre categorie:

1. il text mining, attraverso il quale vengono estratti dati grezzi di diverse fonti e organizzati per ottenere informazioni utilizzando algoritmi efficienti;
2. il machine-learning, in cui si genera un modello (ad esempio, rete neurale artificiale, macchina vettoriale di supporto, albero decisionale, foreste casuali) da utilizzare per prevedere le interazioni farmaco-bersaglio
3. gli approcci network-based, attraverso i quali i dati biologici (ad esempio, le vie metaboliche, le interazioni farmaco-bersaglio, le interazioni tra proteine) sono modellati come una rete da applicare per ottenere nuove informazioni e trovare nuove proprietà terapeutiche dei farmaci.

Dopo aver previsto le interazioni tra farmaci e target, diversi database come MalaCards e DisGeNET, che contengono informazioni relative a malattie e geni, possono essere utilizzati per scoprire nuovi benefici terapeutici dei farmaci esistenti.

Nell'ambito della scoperta dei farmaci, i database sono fondamentali, dato il ruolo chiave per i vari metodi di riposizionamento dei farmaci. Pertanto, è necessario che siano progettati in modo adeguato e che includano applicazioni che aiutino i ricercatori a ottenere risultati migliori. La Figura 1 rappresenta una statistica delle ricerche pubblicate relative al riposizionamento dei farmaci. Per ottenere il numero delle pubblicazioni sul riposizionamento dei farmaci, lo spazio di ricerca è stato limitato ai documenti che comprendevano tra le parole chiave "drug repurposing or repositioning" nella sezione PubMed del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Inoltre, per acquisire il numero delle pubblicazioni di database sul drug repurposing, i risultati della sezione PubMed del NCBI sono stati limitati a quelli che comprendevano le parole chiave "drug repurposing or repositioning" e "database". Per l'elenco generato, è stato effettuato un controllo manuale. E poi, i risultati sono stati riportati nel grafico. Nella Figura 1, il numero di pubblicazioni, relative al "drug repurposing"

e ai database progettati per esso, negli anni 2000 e il 2018. Nell'intervallo 2000 e 2010, il tasso di ricerche basate sul riposizionamento di farmaci è quasi costante. Dopo il 2010, il numero di ricerche è aumentato con l'aumento del numero di database specializzati per il riposizionamento dei farmaci. Ciò può essere dovuto alla maggiore disponibilità di dati e strumenti adeguati, come i servizi web che estraggono e analizzano i dati. L'indice di correlazione di Pearson tra il numero di pubblicazioni per il riposizionamento dei farmaci e le banche dati specifiche progettate per esso è pari a 0,9884. Dato il valore del coefficiente di correlazione, si può trovare una relazione significativa tra di loro.

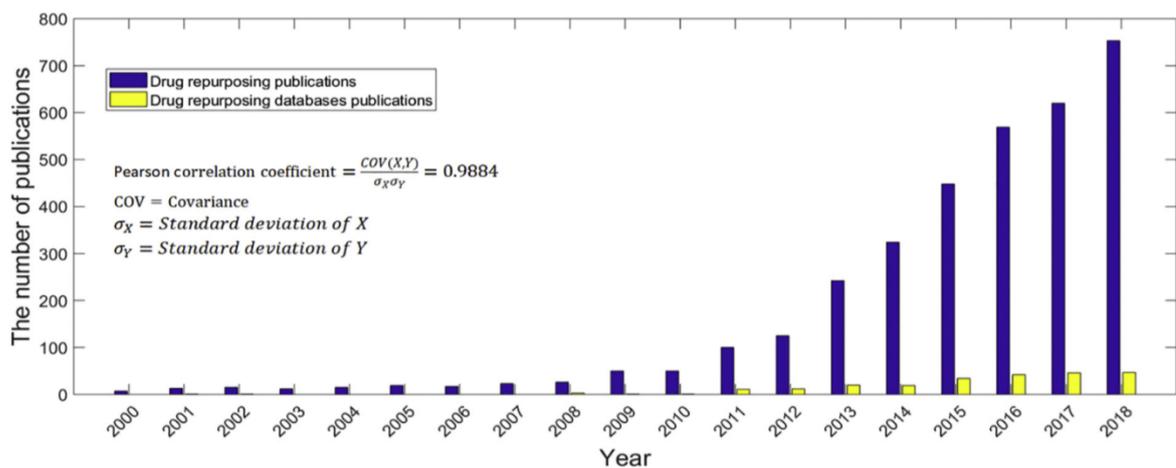


Figura 1. Numero di database e pubblicazioni sul riposizionamento dal 2000 al 2018

Classificazione delle banche dati e loro contributo al riposizionamento

Da quando è emerso il riposizionamento dei farmaci come metodo per svilupparne di nuovi, sono stati progettati diversi database. La Figura 2 li categorizza in base ai dati da loro contenuti e alle applicazioni nel riposizionamento dei farmaci; ciascuna categoria può essere utilizzata nella progettazione e nel riposizionamento.

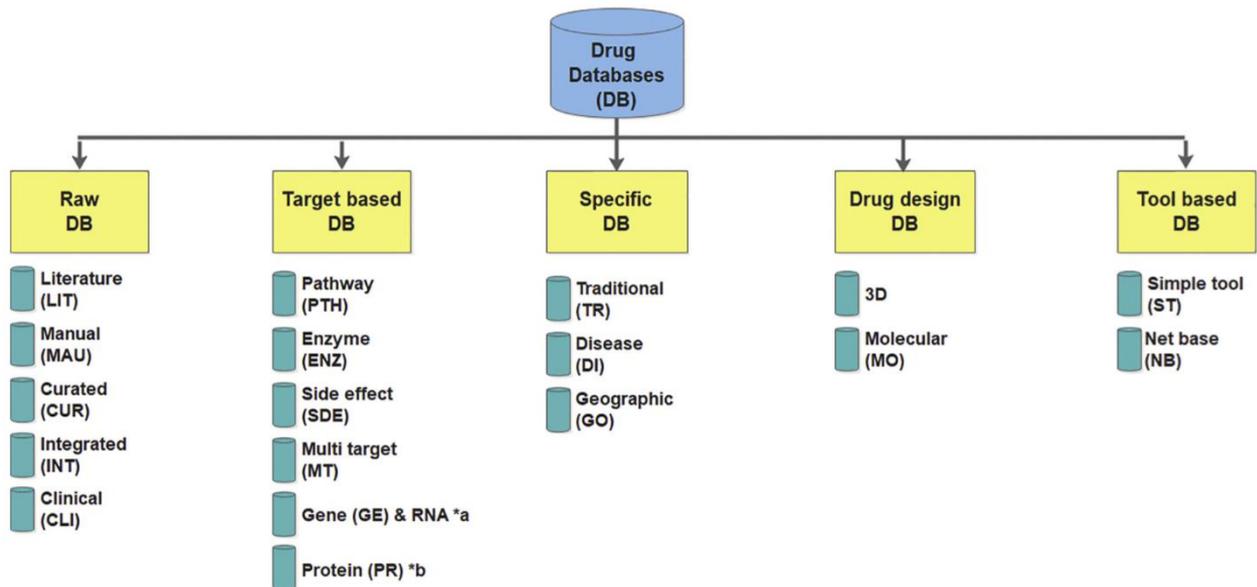


Figura 2. Classificazione dei vari database

1. Database di dati grezzi: i database di questa categoria contengono diversi dati che sono organizzati in alcune tabelle. Anche se questi dati sono preziosi e sono stati sviluppati molto tempo fa; la maggior parte di essi non sono adatti ad uno specifico riposizionamento dei farmaci. Tuttavia, possono contenere informazioni nascoste che possono essere estratte dagli approcci di data mining e che sono utili per lo sviluppo di nuovi database. Nella creazione di questo tipo di database, vengono utilizzate cinque fonti di dati (Literature, Manual, Curated, Integrated e Clinical). Se la fonte è la letteratura i risultati del drug repurposing sono direttamente riversati in un database. Se la fonte di dati è quella manuale, alcuni tecnici esperti sono impiegati e istruiti per l'inserimento manuale dei dati in un database. Analogamente al metodo manuale, un gran numero di biologi viene coinvolto nel processo di curare i dati esistenti per poi essere sistematizzati e pubblicati in

una nuova banca dati. Se il data base è di tipo integrato, dati disparati ottenuti da singole banche dati vengono introdotti in un nuovo database che può accelerare e migliorare le applicazioni per il drug repurposing. Oltre alle fonti menzionate, i dati clinici hanno un elevato livello di importanza e possono portare a nuovi concetti scientifici per il riposizionamento dei farmaci, rappresentano quindi la quinta fonte di raccolta dati.

2. Database basato sui target: questa categoria prevede database che contengono i target dei farmaci, come per esempio i geni insieme al database complement MAP (CMAP), l'RNA come RNA lungo non codificante (lncRNA), informazioni sulle mutazioni, le proteine target e le informazioni sulla connettività MAP (DMAP) tra proteine e farmaci, via metaboliche, enzimi, effetti collaterali o una raccolta di diversi target. Utilizzando database di questo gruppo, la strategia di riposizionamento dei farmaci può evolversi in modo differente. Alcuni esempi possono essere i seguenti: (a) i metodi di riposizionamento dei farmaci GWAS (Genome-Wide Association) e PheWAS (Phenome-Wide Association) esaminano i target dei geni e valutano i loro effetti su una malattia o viceversa. Se un gene è correlato a una patologia, i farmaci che possono inibire l'espressione del gene, vengono introdotti per trattare la patologia. (b) Gli effetti collaterali sono un'informazione interessante da valutare per il riposizionamento dei farmaci, in parte perché tutti gli effetti collaterali non sono sfavorevoli, alcuni di essi (come ad esempio nel caso del sildenafil) possono fornire indicazioni utili. (c) L'indagine delle vie di segnalazione o delle vie metaboliche può consentire di scoprire la causa principale di malattie rare od orfane e di conseguenza trovarne la cura. I farmaci, che possono modulare le vie, vengono analizzati e proposti per il trattamento della malattia. (d) Gli lncRNA sono una classe di RNA trascritti che consiste di oltre 200 nucleotidi. Anche se non codificano le proteine, gli lncRNA possono inibire o attivare i geni. Pertanto, possono essere considerati un'opzione interessante per il trattamento di malattie.
3. Database specifico: alcune banche dati comprendono dati che sono forniti per un'applicazione specifica. Queste banche dati rientrano nella terza categoria (Figura 2) e comprendono tre diverse tipologie di dati, come segue: a) Dati sulla medicina tradizionale, che di solito si riferisce all'uso di principi attivi vegetali per curare le malattie. Come nel caso del riposizionamento di farmaci, questi dati possono essere utilizzati per scoprire nuovi usi dei principi attivi esistenti. Inoltre, si può studiare la possibilità di sostituire un

principio vegetale con un farmaco o meno. In caso positivo, si hanno molti vantaggi perché la maggior parte di farmaci di natura vegetale non presentano le complicazioni dei farmaci sintetici. (b) Dati specifici sulla malattia, cui alcuni database sono stati progettati per contenere le informazioni su una determinata malattia. Disponendo di dati adeguati, le ricerche possono essere accelerate e possono essere scoperti nuovi metodi di cura. (c) Il Database geografico può essere utile in termine di distribuzione delle malattie, poiché alcune malattie compaiono in zone specifiche del pianeta. Pertanto, il database geografico può portare a identificare sia il motivo di una specifica malattia confrontandola con altre che farmaci già esistenti per il suo trattamento.

4. Database di progettazione di farmaci: questi database includono tipicamente dati derivanti da proteine a basso peso molecolare. Sulla base delle caratteristiche del bersaglio biologico, può essere progettato un farmaco che può interagire con esso. Il processo di progettazione di un farmaco è dispendioso sia in termini di tempo che di profilo economico. Molte progettazioni di farmaci falliscono e solo pochi di essi ottengono il certificato FDA. I farmaci esistenti, che possono legarsi correttamente al bersaglio, possono essere studiati e valutati per una specifica applicazione. A questo proposito sono stati sviluppati diversi database, che contengono la struttura 3D di diverse proteine e le informazioni su eventuali sostituzioni molecolari, che si basano proprio sulle strutture proteiche tridimensionali. In questo ambito, possono poi essere utili applicazioni software (come il docking) e database che calcolano il punteggio di somiglianza di due strutture, valutandone i punteggi, i dati sperimentali e i risultati riportati. I dati ottenuti, inoltre, possono essere utilizzati per identificare nuovi effetti collaterali in un farmaco.
5. Database basato su strumenti: i database che consistono di tools e web server, sono collocati nella quinta categoria. Questi tipi di database si basano di solito sui dati raccolti da altri database. Convenzionalmente, per estrapolare i dati sono usati vari metodi come per esempio la network theory e gli approcci di data mining, per poi proporre una lista di possibili farmaci analoghi ad un certo farmaco specifico. Questi strumenti svolgono anche un ruolo importante per validare i risultati di riposizionamento dei farmaci. Per esempio, un elenco di farmaci riposizionati su un farmaco specifico, elenco acquisito dal machine learning o altri metodi, può essere confrontato con una lista che si ottiene usando altri tools. In questo modo, l'intersezione delle liste può presentare relazioni significative tra i

farmaci selezionati e gli obiettivi previsti. Inoltre, i risultati dei tools e dei web server possono portare a trarre delle rilevanti conclusioni.

Database

Finora sono state sviluppati diversi database che possono essere utilizzati per il riposizionamento dei farmaci o svolgere un ruolo utile in tale processo. Oltre ai database, i tools, sviluppati dai database, possono essere utilizzati per il riposizionamento dei farmaci. La Figura 3 presenta i database e il loro contenuto di dati che sono già stati categorizzati nella Figura 2. Per esempio, il database DrugBank comprende enzimi, strutture 3D, farmaci e target, vie metaboliche e informazioni sugli effetti collaterali. Inoltre, per tutti i database, è mostrata la loro categoria principale.

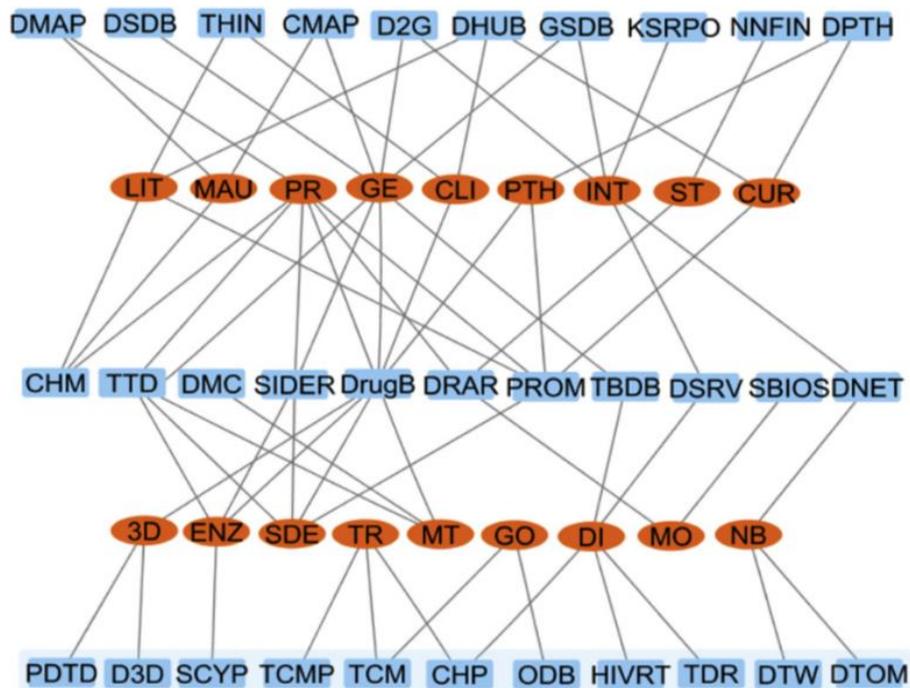


Figura 3. I database (blu) e i loro contenuti principali (arancione)

I database esistenti presentano alcuni limiti. Attraverso qualche modifica si potrebbe aumentare il loro utilizzo, accelerando le ricerche nel campo del riposizionamento dei farmaci. Le principali limitazioni di cui soffrono questi database sono elencate qui di seguito:

1. *Disponibilità*: È auspicabile che le banche dati pubblicate siano accessibili. Tuttavia, si osserva che alcune di esse non sono pubbliche. Ad esempio, il Potential Drug Target Database non è completamente accessibile da qualsiasi utenza. Nel verificare la disponibilità dei relativi siti web, è sempre importante controllare tramite programmi appositi che non siano oscurati a causa della propria localizzazione.
2. *Update*: Anche se la maggior parte dei database sono disponibili e continuano ad essere aggiornati sia sotto il profilo dei dati che delle interfacce web. Alcuni di essi, come per esempio il Traditional Chinese Medicine (TCM), non sono più aggiornati.
3. *Tool*: Per aumentare la capacità e l'utilizzo dei database, alcuni di essi forniscono un tool specifico per il riposizionamento di farmaci, come per esempio il SCYP (Super Cytochrome P450). La presenza di un tool specifico però non è necessariamente presente in un database, come invece la capacità di recupero e di memorizzazione delle informazioni.
4. *Ricerca avanzata*: Si parla di capacità di recupero rapido dei dati. Per esempio, DrugBank incorpora tale capacità, mentre altri come The Health Improvement Network (THIN) non la prevedono.
5. *Query*: L'interrogazione da parte di un utente del database può essere specifica. Diverse banche dati come Drug Repurposing Hub (DHUB) hanno un loro linguaggio. Da notare che un *Structured Query Language* (SQL) è un linguaggio di database che può unire, riassumere, selezionare, classificare, criptare, decriptare e limitare i dati in maniera diretta. Un sistema di gestione di database (DBMS) che supporta l'SQL, ottimizza le query espresse attraverso metodi efficienti garantendo elevate prestazioni e affidabilità. Ad eccezione di DrugR+, nessuno dei database in oggetto prevede le caratteristiche SQL.
6. *Export*: I database esistenti contengono informazioni utili che possono essere estrapolate attraverso vari metodi. Dopo aver visto i risultati, i ricercatori necessitano di poterli scaricare come file individuali per fare poi un'ulteriore elaborazione e studio. A tal fine, diversi database hanno creato la possibilità di esportare i dati, come per esempio il Tropical Disease Research.
7. *Application programming interface (API)*: È un concetto di programmazione web, che permette all'utente di sfruttare una banca dati utilizzando un metodo di programmazione

sistematica. Utilizzando un'interfaccia di applicazione di programmazione (API), gli utenti esperti possono acquisire i risultati desiderati e poi utilizzarli per il riposizionamento dei farmaci. In questo modo, i database come il ChEMBL risultano essere grandi risorse per il data mining.

8. *Responsive*: Lo sviluppo notevole delle tecnologie "mobili" ha portato molte aziende commerciali e istituti finanziari a fare un enorme investimento per offrire i loro servizi su piattaforme mobili. Diversi studi hanno messo in evidenza l'importanza della tecnologia mobile nella diffusione e nell'estensione dei servizi. Sembra quindi che un database possa essere più fruibile e più pratico se può essere utilizzato su piattaforme mobili.
9. *Full Download*: Anche se alcuni database hanno capacità affascinanti e utili, non sono scaricabili tutte le loro informazioni. In alcuni casi, gli utenti devono scaricare tutti i dati e applicare le proprie metodologie su di essi per analizzarli. Per questo motivo, tutte le parti di un database dovrebbero essere scaricabili in modo appropriato. Da questo punto di vista, i database quali Tuberculosis Database, Tropical Disease Research, Therapeutic Target Database, The Health Improvement Network, Drug Signatures Database e Traditional Chinese Medicine sono completamente scaricabili, le strutture 3D di DrugBank invece no e può rappresentare un problema.
10. *Classified structure*: I database dei farmaci hanno una grande dimensione e contengono informazioni diverse. Pertanto, la classificazione in più parti può consentire agli utenti di ottenere i dati richiesti in modo appropriato. Tuttavia, anche se la maggior parte dei database hanno effettuato classificazioni dei propri dati, altri come l'Ontario Database non lo hanno fatto.
11. *Gratuito*: Lo sviluppo di un database dei farmaci è un progetto lungo e complicato, che richiede competenze e investimenti appropriati. Di conseguenza, alcuni sviluppatori limitano la capacità di utilizzo del loro database, salvo un pagamento di una tassa da parte degli utenti. Inoltre, alcuni di loro richiedono di presentare e certificare le informazioni. Per esempio, gli utenti devono acquisire una licenza per l'uso dell'interfaccia di applicazione di programmazione (API). I database di farmaci gratuiti accelerano le ricerche accademiche e possono portare a scoperte interessanti nell'area del riposizionamento di farmaci.

Tabella 3. Confronto tra database basato sulle loro funzionalità

DB/TO	Available	Update	Tool	Advanced search	Query (SQL)	Export	API	Responsive	Full download	Classified structure	Free
CHM	✓	✓		✓		✓	✓		✓	✓	✓
DrugB	✓	✓		✓			✓	✓		✓	✓
ODB	✓	✓									
THIN	✓	✓									
TCM	✓			✓							✓
TBDB	✓					✓			✓	✓	✓
TTD	✓	✓		✓					✓	✓	✓
PDTD			✓								
TDR	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓
HIVRT	✓	✓								✓	
TCMSP	✓	✓									✓
SCYP	✓	✓	✓							✓	✓
DHUB	✓	✓				✓	✓	✓			
DSDB	✓								✓	✓	✓
PROM	✓		✓	✓							✓
DRAR	✓		✓								✓
DMAP	✓	✓		✓						✓	✓
CMAP	✓	✓		✓						✓	
DMC			✓								
SIDER	✓	✓							✓	✓	✓
KSRPO	✓		✓						✓		✓
NNFIN	✓		✓				✓				✓
DSRV	✓										✓
CHSP										✓	
3D	✓	✓							✓		✓
D2G										✓	
GSDB	✓			✓					✓	✓	✓
SBIOS	✓	✓	✓								✓
DTOM			✓								
DPTH	✓								✓		✓
DTW	✓		✓								✓
DNET			✓								✓
DrugR +	✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
SUT	✓	✓		✓						✓	✓
DTC	✓	✓		✓			✓	✓	✓	✓	✓
KEGG	✓	✓		✓			✓		✓	✓	✓

CHM: ChEMBL; DrugB: Drug-Bank; ODB: Ontario database; THIN: The Health Improvement Network; TCM: Traditional Chinese Medicine; TBDB: Tuberculosis Database; TTD: Therapeutic Target database; PDTD: Potential Drug-Target Database; TDR: Tropical Diseases Research; HIVRT: HIV Drug Resistance Database; TCMSP: Traditional Chinese Medicine Platform; SCYP: Super Cytochrome P450; DHUB: Drug Repurposing Hub; DSDB: Drug Signatures Database; PROM: Promiscuous; DRAR: Drug Repurposing Adverse Reaction; DMAP: Drug-Protein connectivity MAP; CMAP: Complement Map database; DMC: Drug Map Central; SIDER: Side Effect Resource; KSRPO: A platform for drug Repositioning; NNFIN: Network-based similarity finder; DSRV: Drug survival database; CHSP: anti-Cancer Herbs database for System Pharmacology; D2G: Drug to Gene; GSDB: Gene Set Database; SBIOS: Swiss BIOisostere; DTOM: Drug Target interactome database; DPTH: Drug Pathway database; DTW: Drug Target Web; DNET: Drug-disease Network database; SUT: SuperTarget database; DTC: Drug Target Commons; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Nella Tabella 3, sono presenti i database principali con indicate le caratteristiche sopra discusse.

Come mostra la Tabella 3, DrugR+, ChEMBL e TDR sono quelli con maggiori funzioni rispetto ad altri. Considerato le tipologie di dati e database discussi in precedenza nel riposizionamento dei farmaci, è possibile distinguere i database in grezzi, curati sperimentalmente, integrati e computazionali.

Database grezzi

Questa classe comprende i database che contengono informazioni primitive sui farmaci e i loro target. Solitamente, i metodi di text mining e di machine learning sono approcci adatti per il riposizionamento dei farmaci. I database, che si inseriscono in questa classe, sono i seguenti:

1. Il *The Health Improvement Network (THIN)* raccoglie dati medici generali considerando l'età, il sesso, i parametri socioeconomici e altri parametri. Sulla base dei risultati riportati, è possibile scoprire l'efficacia dei farmaci in diverse condizioni. Inoltre, questi dati mostrano che il riposizionamento dei farmaci può essere considerato in altri processi finora ignorati, offrendo nuove opportunità.
2. L'*Ontario Database (ODB)* comprende i farmaci prescritti ai pazienti in Ontario. È dimostrato che le informazioni genomiche delle creature viventi sono leggermente diverse l'una dall'altra in parti diverse del mondo. Pertanto, l'efficacia dei farmaci sui bersagli può variare da un luogo all'altro. I dati riportati possono produrre nuove indicazioni o nuovi utilizzi per i farmaci esistenti.
3. L'*HIV Drug Resistance Database (HIVRT)* è stato sviluppato per conservare informazioni sulla HIV e sui farmaci che possono prevenirla o inibirla. I suoi dati riguardano la sorveglianza e le informazioni antiretrovirali di farmaci assieme ai virus che risultano essere resistenti ai farmaci, le cui mutazioni vanificano l'efficacia terapeutica. A tal fine, il riposizionamento dei farmaci può essere un metodo promettente per risparmiare tempo e costi.
4. Il *Drug Repurposing Hub (DHUB)* fornisce una libreria per le applicazioni di riposizionamento e i nuovi risultati raggiunti relativi all'area di interesse. Per esempio, coinvolge articoli, notizie, farmaci precedentemente riposizionati e molti altri dati pubblicati in questo campo. Per la ricerca e l'acquisizione dei dati, fornisce una query con una specifica sintassi.
5. Il *Drug Repurposing Adverse Reaction (DRAR)* è una biblioteca per i farmaci e i loro effetti collaterali. Oltre a questi dati, fornisce un tool che, dopo aver caricato un farmaco o una molecola, suggerisce un potenziale elenco di indicazioni per questo farmaco. Ottenuto l'elenco, si studiano le interazioni tra farmaci e target e si confrontano i risultati con quelli acquisiti in base al profilo di espressione genica.

6. Il *3D* costituisce la classe dei database che contengono le strutture chimiche tridimensionali dei farmaci e i dati relativi alla progettazione di farmaci tramite la frammentazione. L'efficacia di un farmaco su un bersaglio dipende dalla sua capacità di legarsi in modo adeguato ad esso. Sulla base delle informazioni sulla struttura 3D, i metodi di docking cercano di fornire un complesso in cui il farmaco e la proteina bersaglio presentano un'interazione più stabile.
7. L'*Anti-Cancer Herbs Database for System Pharmacology (CHSP)* contiene informazioni sugli effetti farmacologici dei principi attivi vegetali su patologie oncologiche. Il meccanismo d'azione di alcuni prodotti naturali e le loro proprietà bioattive sono sorprendenti e possono portare a nuove opportunità per il riposizionamento dei farmaci. Inoltre, alcuni database come *RNAcentral*, *NONCODE database*, *lncRNAdb*, e *lncRNADisease* mediano le informazioni sull'RNA e possono essere utili nelle ricerche che prendono in considerazione le interazioni tra farmaci e RNA.

Database curati sperimentalmente

Questa classe di database comprende dati grezzi che sono stati controllati da esperti. Come per la prima categoria, anche in questa i metodi di text mining e di machine learning sono approcci adatti per il riposizionamento dei farmaci. I Database, che si inseriscono in questa classe, sono i seguenti:

1. Il *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)* e *ChEMBL* sono grandi database che contengono composti bioattivi simili a farmaci e informazioni relative al loro assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione e tossicità (ADMET). Per garantirne la qualità dei dati, gli esperti hanno effettuato rigorosi controlli dei dati in essi contenuti. Anche se KEGG e ChEMBL non sono stati progettati per il riposizionamento farmaceutico, possono essere utilizzati a questo scopo, fornendo uno strumento che estrae i suoi dati e propone un elenco di potenziali farmaci. Inoltre, la preparazione di query SQL e le capacità di risposta ne facilitano l'applicabilità. Considerando l'importanza di KEGG e ChEMBL, sono stati creati alcuni database ispirati a di essi. Per esempio, il *Drug Pathway Database (DPTH)* consiste in dati delle vie di segnalazione che sono stati presi da KEGG e arricchiti. Questi dati permettono ai ricercatori di indentificare i farmaci per le malattie orfane e rare proprio utilizzando le vie di segnalazione indotte dalla malattia stessa.

2. *DrugBank* è uno dei database più importanti nell'ambito della scoperta dei farmaci e contiene informazioni complete sui farmaci e loro vari bersagli, come geni, proteine, enzimi e diversi tipi di vie metaboliche. Mentre alcuni database contengono informazioni sugli ipotetici target dei farmaci, i suoi dati incorporano dati convalidati e approvati sperimentalmente. Pertanto, la maggior parte delle ricerche sono state effettuate sulla base di questi dati per ottenere risultati reali.
3. Il *Therapeutic Target Database (TTD)* fornisce informazioni sui farmaci e sui loro bersagli. Rispetto a DrugBank, TTD mostra informazioni con dettagli e determina quanto un farmaco influisce su un bersaglio. Inoltre, include alcuni effetti sinergici dei farmaci, geni knockout, difficoltà della sperimentazione clinica, ecc.
4. Il *Tuberculosis Database (TBDB)* comprende informazioni sulle mutazioni relative ai bersagli virali. Utilizzando questo database, le ricerche sulla scoperta di farmaci possono essere accelerate e si possono elaborare nuove idee per il riposizionamento dei farmaci.
5. Il *Side Effect Resource (SIDER)* comprende informazioni sugli effetti collaterali dei farmaci o sulle loro reazioni avverse che sono state segnalate clinicamente. Questo database è di importanza per quei metodi di riposizionamento che si basano sulle conseguenze fenotipiche.
6. Il *Traditional Chinese Medicine (TCM)* ha al suo interno informazioni sulla medicina tradizionale cinese. In questo database sono accessibili strutture 3D di piccole molecole a basso peso molecolare che possono essere utilizzate in studi di screening virtuale e di simulazione molecolare. Per le applicazioni menzionate, TCM fornisce una web query che permette agli utenti di cercare ingredienti, piccole molecole e sottostrutture.

Database integrati

Sono i database che raccolgono e combinano i dati da diverse fonti. L'integrazione dei dati esistenti permette di ottenere informazioni più accurate e utili. I database, che possono essere considerati in questa classe, sono i seguenti:

1. La *Traditional Chinese Medicine Platform (TCMSP)* è stata sviluppata sulla base di un'idea interessante considerando che i principi attivi di origine vegetali e possono essere usati per trattare le patologie. Oltre ai diversi componenti, questo database prende in considerazione anche le proprietà farmaceutiche. Sembra che i concetti di

riposizionamento farmaceutico possano essere estesi anche ai principi attivi di origine vegetale.

2. Il *Super Cytochrome P450 (SCYP)* fornisce le informazioni relative al citocromo P450, enzima responsabile dell'eliminazione di sostanze tossiche dall'organismo. Questo enzima considera un farmaco come un veleno che deve essere metabolizzato, facendo in modo che alcuni farmaci perdano la loro utilità venendo scartati e non potendo interagire con il bersaglio proteico. In questi casi, la terapia combinata può essere un'opzione appropriata per migliorare l'efficacia di un farmaco.
3. Il *Drug-Protein Connectivity (DMAP)* include i farmaci e i loro target proteici ed è stato progettato per superare la limitazione dei dati del *Complement Map Database (CMAP)*. Segnala l'efficacia di un farmaco sui target proteici. Utilizzando i risultati ottenuti attraverso un metodo sistematico, si possono analizzare e scoprire nuove applicazioni per un farmaco inserito.
4. Il *Drug Map Central (DMC)* è un database integrato che comprende informazioni chimiche, target di farmaci e vie di segnalazione. Inoltre, il suo servizio web supporta una query che ricerca dati a più livelli e prevede nuove indicazioni per un farmaco conosciuto.
5. Il *KSRPO* raccoglie dati sull'espressione genica, relativi al cancro della prostata, da varie fonti per assemblarli in un database completo. Come altri database, è utile nel riposizionamento in quanto predice computazionalmente i farmaci che possono trattare il cancro alla prostata.
6. Il *Drug Survival Database (DSRV)* comprende alcuni set di dati relativi alle malattie tumorali, introduce nuovi usi per alcuni farmaci con applicazioni in oncologia e li classifica in base alle informazioni sulla sopravvivenza del paziente. Pertanto, il ruolo di questo database è fondamentale nel settore sanitario. Tuttavia, il database fornisce solo una potenziale lista di farmaci per una specifica malattia, saranno gli esperimenti clinici a determinare quanto sia utile la lista generata.
7. Il *Drug to Gene (D2G)* raccoglie dati da 19 database pubblici e li compatta in un database integrato. L'idea principale del D2G è fornire corretti dati consolidati tra le interazioni di farmaci e target. Di conseguenza, studi relativi alla scoperta di un farmaco possono velocizzarsi.

8. *Il Gene Set Database (GSDB)* raccoglie i dati sui geni da 26 set di dati pubblici e li integra tra loro per creare un database unico. Nella raccolta dei dati, gli sviluppatori si sono concentrati sulla farmacologia e sulle informazioni provenienti dalle patologie umane.

Database Computazionali

Questa categoria di database, oltre ai dati, propone sia uno strumento che estrae i dati esistenti sia un elenco dei vantaggi del riposizionamento farmaceutico. Alcuni esempi di database, che si inseriscono in questa classe, sono i seguenti:

1. Il *Tropical Diseases Research (TDR)* costituito da dati patogenici e genomici, dà priorità ai geni e include uno strumento che predice le interazioni tra i geni e i farmaci. L'obiettivo principale di TDR è quello di facilitare l'identificazione di potenziali farmaci per le malattie tropicali. Con la creazione di una query SQL o di funzionalità API, questo database potrebbe diventare il più utilizzato nel riposizionamento dei farmaci.
2. Il *DrugR+* facilita le applicazioni di riposizionamento dei farmaci utilizzando metodi di data mining. A questo scopo, DrugR+ ricerca i target, il meccanismo d'azione sui target e le reazioni avverse dei farmaci. Successivamente, i risultati acquisiti vengono classificati in base al numero di effetti collaterali. Questo database oltre che per il riposizionamento può essere utilizzato anche in caso di terapia combinata.
3. Il *Drug Signatures Database (DSDB)* è un database basato sui geni, i farmaci e alcuni composti che influenzano i target genici. Poiché l'espressione di un gene può portare all'espressione di altri geni, essi vengono analizzati e considerati come un insieme. A questo scopo, DSDB ha proposto un tool che può essere usato per l'integrare di set di geni.
4. Il *Potential Drug-Target Database (PDTD)* è un database che identifica i target in silico e contiene la struttura 3D di varie proteine, fornendo dati appropriati per effettuare studi di docking. Utilizzandolo, vengono forniti i potenziali target che potranno interagire con il farmaco in studio.
5. Il *Promiscuous (PROM)* struttura i dati tramite network, prevedendo nuovi usi per i farmaci esistenti tramite la valutazione dei loro effetti collaterali. Nella fase di raccolta dei dati di PROM, vengono impiegati metodi di data mining, come il text mining, per acquisire informazioni sull'interazione tra farmaci e proteine. Successivamente, i dati subiscono un secondo controllo manuale per migliorarne la leggibilità. Nel PROM si possono trovare informazioni varie, come farmaci approvati, studi clinici e farmaci ritirati.

6. Il *Network-based Similarity Finder (NNFIN)* ricerca dati trascrittomici per trovare informazioni simili. Quando dati omologhi vengono scoperti, i farmaci possono essere riposizionati per la nuova patologia. Questo metodo è uno dei metodi più importanti per il trattamento di malattie orfane o rare.
7. Il *Drug-disease Network Database (DNET)* tramite un network combina dati genomici eterogenei per determinare un elenco di farmaci per la patologia in fase di studio o viceversa.

Oltre ai database sopra menzionati, ne esistono altri che si basano su essi. Ad esempio, *Drug Target interactome database (DTOM)* che è fondato sui dati di DrugBank, oppure *Drug Target Web (DTW)* costituito da un network basato sempre su DrugBank, entrambi utilizzati per il riposizionamento di farmaci.

4. Riposizionamento farmaci in varie patologie

Sistema nervoso centrale

Recentemente Gaspar (2019) ha riportato un nuovo e promettente approccio in silico per il riposizionamento di farmaci basato sulle 44 varianti di rischio pubblicate dagli studi di associazione genome-wide per il disturbo depressivo maggiore. Gli autori hanno utilizzato lo strumento online Drug Targetor (drugtargetor.com) per valutare le interazioni tra i farmaci e i loro bersagli, le statistiche di associazione genome-wide e i livelli di espressione genetica previsti nei diversi tessuti. Le conclusioni di questo studio hanno messo in evidenza 153 geni con una correlazione significativa con il disturbo depressivo maggiore. Gaspar ipotizza che, tra questi, 5 siano geni down- o up- regolati nelle regioni cerebrali e 24 siano geni attivabili a seguito dell'assunzione di farmaci.

Il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson sono due importanti patologie del sistema nervoso centrale che non trovano trattamenti terapeutici efficaci. La mancanza di una comprensione completa dei meccanismi e dei molteplici percorsi fisiopatologici coinvolti sono i limiti principali associati a queste due malattie neurologiche. Pertanto, il riposizionamento di farmaci fornisce una speranza di trovare un farmaco utile al trattamento di tali patologie. La tau, una proteina associata a microtubuli agisce coordinando i legami dei microtubuli. È noto che un'aberrazione nella fosforilazione di tau ne interrompe la fisiologia normale ed è la causa di disturbi neurodegenerativi come il morbo di Alzheimer.

Condizioni quali l'iperfosforilazione o fosforilazione anormale di tau sono note essere causate da diverse chinasi come la chinasi ciclina dipendente 5 (CDK5), chinasi regolatrice di affinità dei microtubuli (MARK) e la glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3) più varie chinasi coinvolte in vie di segnale come la protein chinasi A dipendente MAPK e cAMP A, rispettivamente implicate nella regolazione della β/γ -secretasi e della apoptosi neuronale.

Bourque (2018) ha fornito una revisione dettagliata dell'effetto protettivo degli ormoni sessuali, in particolare estrogeni, progesterone, androgeni e deidroepiandrosterone sul morbo di Parkinson attraverso modelli animali e anche con studi sull'uomo. Questi studi suggeriscono che i farmaci che influenzano la neurotrasmissione degli estrogeni, come i modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni o gli inibitori del metabolismo degli steroidi, come gli inibitori della 5 α -reduttasi, potrebbero rappresentare un'opportunità di

riposizionamento nel trattamento del morbo di Parkinson. Gli steroidi sessuali sono anche modulatori della neurotrasmissione.

Zhu (2019) ha segnalato l'opportunità del riposizionamento dell'omeprazolo nella terapia della sclerosi multipla, per la differenziazione e rimielinizzazione degli oligodendrociti. La sclerosi multipla è una malattia immuno-mediata, che causa la disregolazione di diverse cellule infiammatorie e danneggia la guaina mielinica. Finora non si conosce il corretto meccanismo molecolare. Gli autori hanno individuato l'omeprazolo come un potenziale farmaco da utilizzare. La scoperta è stata supportata da dati di microarray estrapolati dal database Gene Expression Omnibus (GEO), che è stato analizzato utilizzando la Connectivity-Map, un database che collega malattie, geni e farmaci. Questo studio ha rivelato che la percentuale di assoni mielinizzati è aumentata dopo la somministrazione di omeprazolo. Si può quindi concludere che l'omeprazolo è un farmaco promettente per la rimielinizzazione associata alla

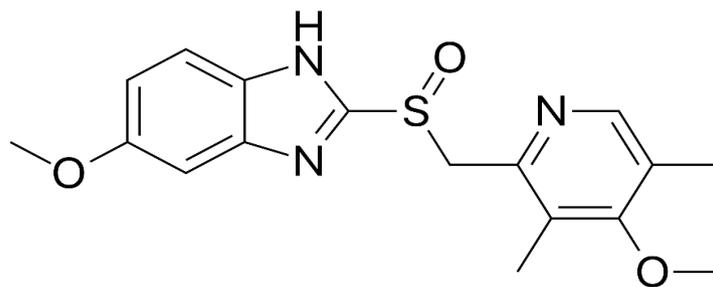


Figura 4. Struttura dell'omeprazolo. [Fonte: Wikipedia]

sclerosi multipla.

Tranfaglia (2018) ha fornito un'indagine dettagliata sulle possibilità di riposizionare farmaci per il trattamento della sindrome del cromosoma X fragile. Si tratta di una delle più comuni cause ereditarie di deterioramento intellettuale e la principale causa monogenica dell'autismo. Gli autori hanno utilizzato il Disease-Gene Expression Matching (DGEM) per l'analisi di riposizionamento, un approccio nuovo e promettente per riposizionare farmaci. Questo studio ha previsto che il sulindac potrebbe essere un candidato potente per un trattamento della sindrome del cromosoma X fragile, e i successivi studi di validazione preclinica hanno mostrato risultati promettenti.

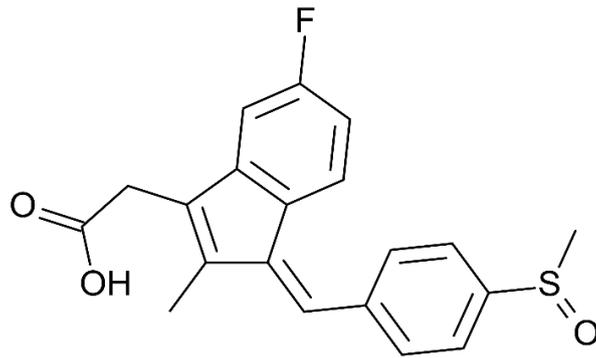


Figura 5. Struttura del sulindac. [Fonte: Wikipedia]

Cancro

Superare la resistenza ai farmaci dei tumori è un enorme ostacolo nella terapia e nella gestione del cancro. È necessario sviluppare strategie adeguate a ridurre al minimo la resistenza ai farmaci e massimizzare l'attività antitumorale. La scoperta e lo sviluppo di agenti terapeutici anticancro sono scoraggiati da molteplici fattori, tra cui la farmacologia, la farmacocinetica, la fisiopatologia del tipo di cancro e il metabolismo dei farmaci. Questa grande sfida può essere risolta con successo con il riposizionamento di farmaci, poiché la maggior parte degli aspetti discussi in precedenza è già nota in misura maggiore e i farmaci sono già in uso terapeutico. La chinasi ciclina-dipendente 5 (CDK5), una treonina o serina chinasi sovraespressa nelle cellule di glioma rispetto agli astrociti umani sani, è responsabile di disfunzione neuronale e morte. Pandey (2019) ha riportato l'aumento dell'attività antitumorale della temozolomide, sia in vitro che in vivo, in associazione alla roscovitina, nota per inibire la CDK5. Questo è un risultato interessante in quanto l'uso di temozolomide da solo non è efficace per i gliomi, a causa di uno sviluppo di resistenza al farmaco da parte delle cellule maligne. Gli autori hanno osservato che il pretrattamento con roscovitina seguito da trattamento con temozolomide ha fortemente aumentato la chemio-sensibilità e bloccato la crescita delle cellule di glioma riducendo l'attività CDK5 con induzione simultanea di autofagia e apoptosi mediata dalla Caspasi-3. Questo studio ha anche mostrato la ridotta espressione di Ki67, GFAP e dei marcatori di angiogenesi (CD31, VEGF) nel caso della terapia temozolomide/roscovitina nel trattamento del glioma. Il CD31, una molecola di adesione cellulare endoteliale piastrinica (PECAM-1) e il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF), giocano un ruolo chiave nella migrazione endoteliale nonché nella proliferazione e sono altamente espresse nei gliomi. La

presenza di astrociti reattivi nelle aree peri-tumorali e nelle aree intorno ai vasi sanguigni è stata notevolmente ridotta nelle sezioni cerebrali trattate con temozolomide/roscovitina.

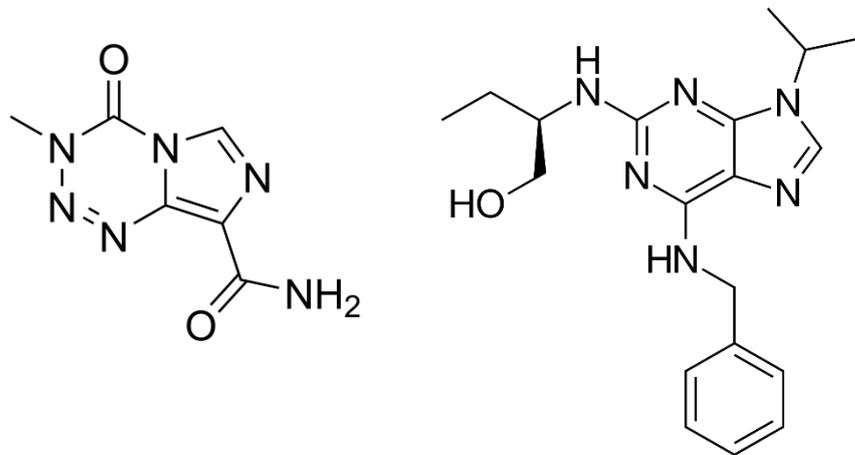


Figura 6. Strutture di temozolomide (sinistra), roscovitina (destra) [Fonte: Wikipedia]

La resistenza ai farmaci limita l'impiego di molti farmaci di tipo oncologico. L'imatinib, utilizzato nella terapia dei tumori stromali gastrointestinali, fra i più comuni tumori mesenchimali del tratto gastrointestinale, ne è un esempio. L'imatinib perde la sua attività a causa dello sviluppo di farmacoresistenza da parte delle cellule tumorali. Anche le terapie di seconda scelta che coinvolgono sunitinib e regorafenib non risultano efficaci per molteplici ragioni, tra cui la citotossicità e la limitata risposta clinica. Lu (2019) ha tentato di risolvere questo problema riposizionando il cabozantinib per il trattamento del tumore stromale gastrointestinale. Gli autori hanno riferito che il cabozantinib ha mostrato una maggiore potenza rispetto all'imatinib contro le mutazioni primarie di cKIT, un recettore della tirosina chinasi che gioca il ruolo principale nella fisiopatologia del tumore stromale gastrointestinale attraverso la segnalazione downstream (a valle) delle vie MEK/ERK/RAS/RAF, STAT 5 e PI3K/AKT. In questo studio, cabozantinib ha mostrato una buona efficacia in vitro e in vivo nei modelli preclinici di cKIT dei tumori stromali gastrointestinali e ha anche mostrato un effetto prolungato e duraturo dopo l'interruzione del trattamento. Questo studio suggerisce che il cabozantinib possa essere in futuro un potente candidato per il trattamento dei tumori stromali gastrointestinali.

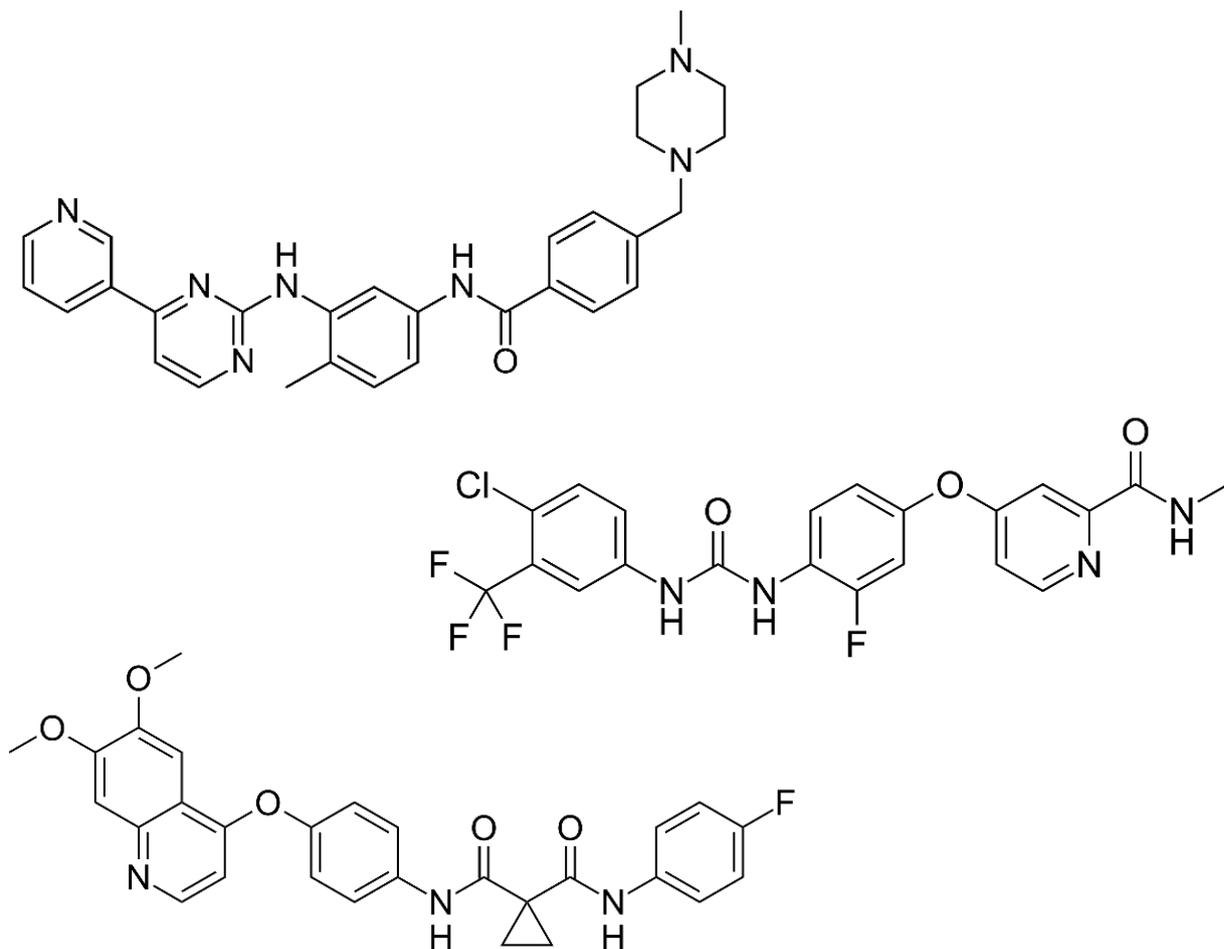


Figura 7. Strutture di imatinib (alto), regorafenib (centro), cabozantinib (basso) [Fonte: Wikipedia]

Il sunitinib è un altro importante chemioterapico inibitore della tirosina chinasi. È stato approvato dalla FDA per il trattamento del carcinoma delle cellule gastrointestinali resistenti all'imatinib. Recentemente, Chatziathanasiadou (2019) ha studiato l'attività del sunitinib contro il glioblastoma multiforme, una delle forme più pericolose di tumore maligno. Il trattamento del glioblastoma multiforme ha molte limitazioni a causa della fisiopatologia sconosciuta della malattia e anche a causa della varietà di fattori fisiologici come la scarsa permeabilità della barriera emato-encefalica. Gli autori hanno sviluppato con successo un metodo tramite cromatografia liquida abbinata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) per la quantificazione in vitro e in vivo di sunitinib in cellule di glioblastoma. Non essendo stati pubblicati altri studi circa l'assorbimento del sunitinib nel glioblastoma multiforme, questo risultato è abbastanza significativo. Il metodo è stato convalidato e riconosciuto secondo le linee guida ISO 17025:2005 e applicato con successo al plasma di pazienti oncologici. La metodologia descritta in questo studio è stata adottata con successo per stabilire un protocollo di valutazione dell'accumulo di sunitinib nelle linee cellulari di glioma M095K.

Questo lavoro darà sicuramente un ulteriore impulso agli studi di riposizionamento di farmaci antitumorali.

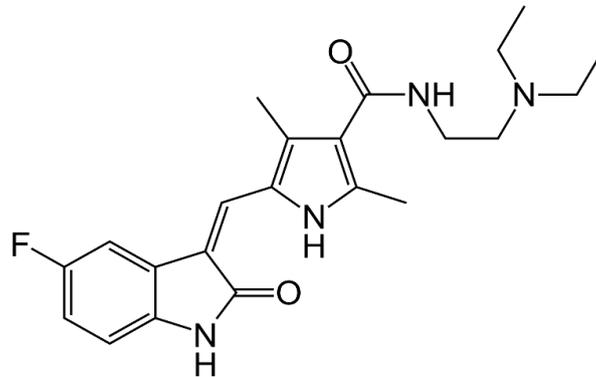


Figura 8. Struttura del sunitinib [Fonte: Wikipedia]

Kuenzi (2019) ha analizzato le opportunità di riposizionamento del tivantinib, un inibitore della proteina c-MET utilizzato nel trattamento della leucemia mieloide acuta attraverso un approccio basato sul target. Gli autori hanno affermato che il tivantinib è un nuovo inibitore della glicogeno sintasi chinasi 3 (GSK3 α/β) che uccide le cellule di leucemia mieloide acuta. Tivantinib come agente singolo o in terapia combinata con venetoclax può rappresentare una nuova interessante opportunità terapeutica per questo tipo di leucemia. Il GSK3 α è stato segnalato come nuovo target nel trattamento della leucemia mieloide acuta per la possibilità di inattivarlo attraverso la stimolazione di diverse vie come PKB/AKT, S6K, RAS-MAPK e le vie di segnalazione di Wnt e di Hedgehog.

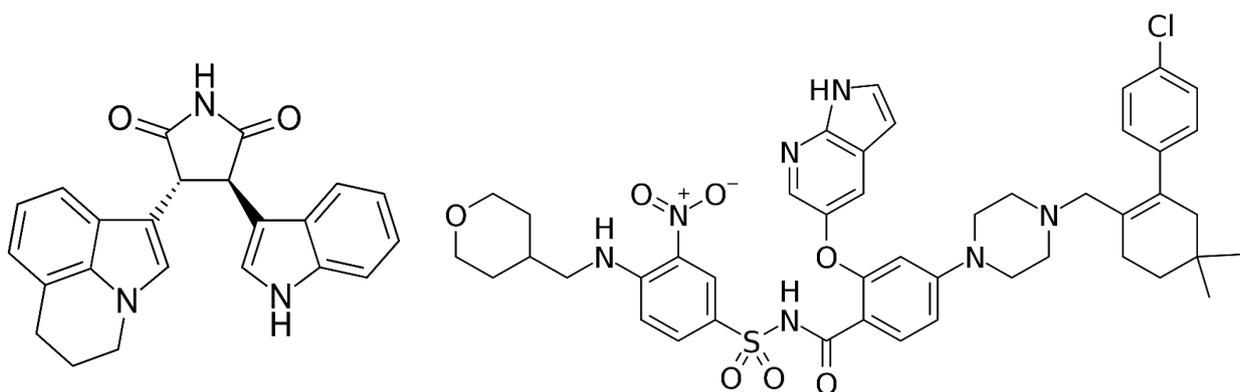


Figura 9. Strutture di tivantinib (sinistra), venetoclax (destra) [Fonte: Wikipedia]

Tuttavia, la maggior parte degli inibitori di GSK3 mancano di specificità per GSK3 α rispetto a GSK3 β e altre chinasi. Questo studio di Kuenzi ha quindi messo in evidenza che il tivantinib da solo o in combinazione con venetoclax può inibire efficacemente la capacità del midollo osseo di formare colonie di cellule mononucleari e offre quindi la possibilità di sviluppare un trattamento per la leucemia mieloide acuta basato sul tivantinib. Ulteriori studi in vivo che chiariscano maggiormente il potenziale antitumorale del farmaco sono necessari.

Alcuni lavori in letteratura hanno messo in evidenza in passato la possibilità di utilizzare il disulfiram, farmaco per il trattamento dell'alcolismo, nella terapia del cancro. Il meccanismo d'azione del disulfiram tuttavia è rimasto a lungo sconosciuto ed è stato esplorato solo di recente. Spillier (2019) ha riportato le relazioni struttura-attività (SAR) dell'inibizione della fosfoglicerato deidrogenasi da analoghi del disulfiram. Questo studio ha fornito una spiegazione del meccanismo di azione del disulfiram come chemioterapico tramite inibizione della fosfoglicerato deidrogenasi come illustrato in Figura 11. Le cellule tumorali sono caratterizzate da un residuo di cisteina 116 mutata a livello della fosfoglicerato deidrogenasi che viene ossidato dal disulfiram impedendo l'esistenza dell'enzima nello stato tetrameric. Questo determina l'inibizione dell'enzima stesso e la proliferazione di conseguenza delle cellule tumorali.

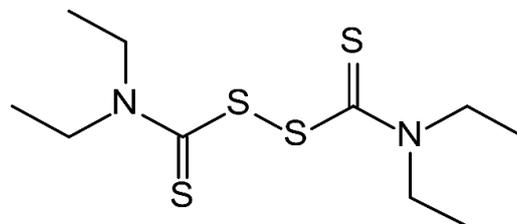


Figura 10. Struttura del disulfiram [Fonte: Wikipedia]

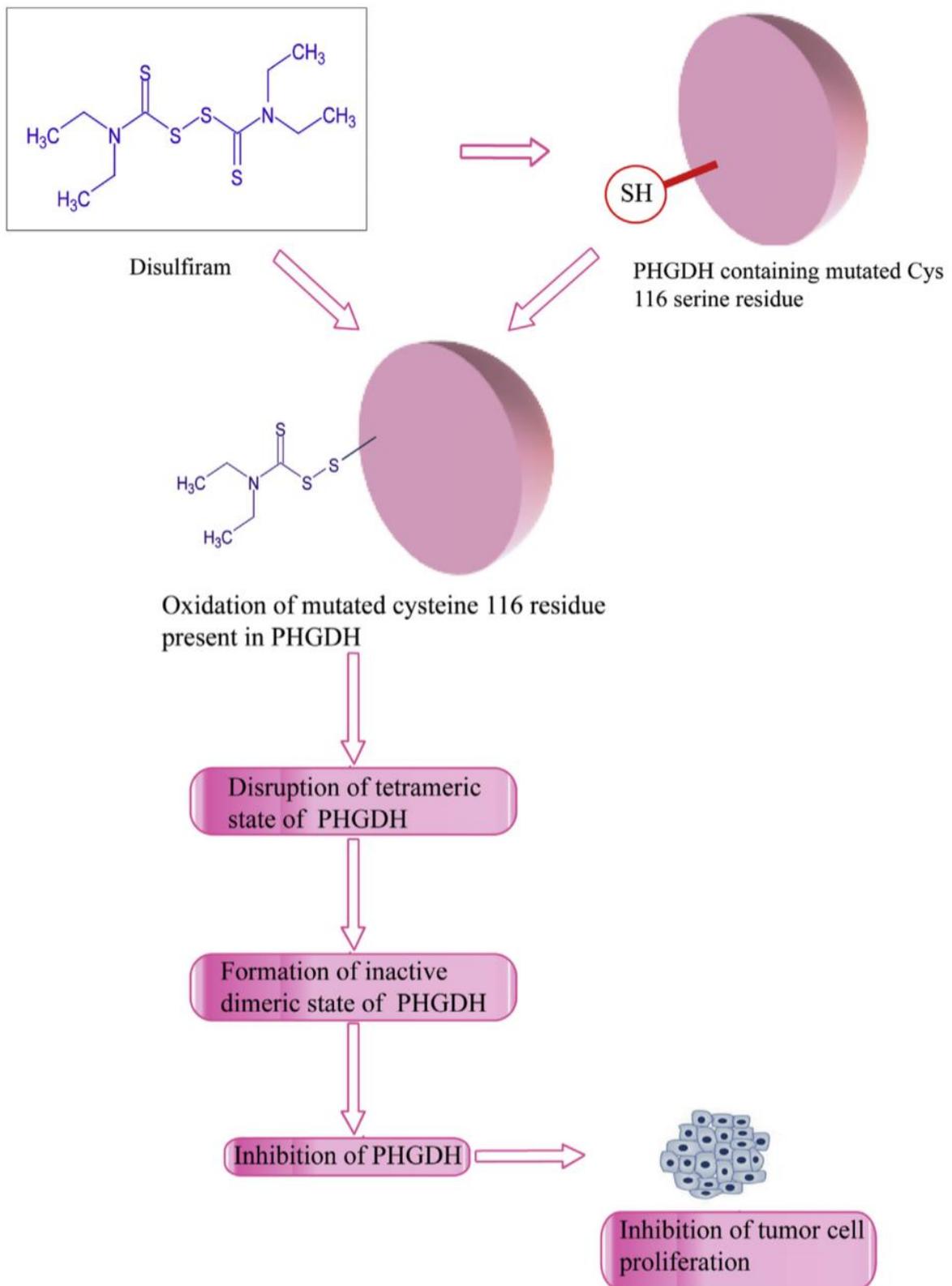


Figura 11. Inibizione della proliferazione cellule tumorali del disulfiram.
 [Fonte: Kumar R. et al. *Eur J Med Chem.* 2019;182:111602]

Malattie infettive

Mihai (2019) ha esplorato il riposizionamento di farmaci antidepressivi a scaffold tricyclico, dibenzo[b,e]tiopinico, contro la replicazione del virus della dengue. Gli autori hanno sintetizzato una serie di derivati della diidrodibenzo[b,e]tiopina e li hanno analizzati in cellule HEK293 infettate con DENV2. In questo lavoro, sono stati condotti anche studi di docking molecolare per confermare l'efficacia dei composti testati sull'elicasi DENV2 NS3. Si è osservato che la maggior parte dei composti sembra inibire esclusivamente l'elicasi virale.

Lv (2018) ha studiato le proteine bersaglio del virus dell'encefalite giapponese per riposizionare farmaci verso questa patologia. Gli autori hanno adottato metodi di biologia dei sistemi, ovvero una combinazione tra i dati di espressione genica e dati provenienti da studi di associazione a livello di fenomeno. Utilizzando questo approccio efficiente, hanno identificato 286 geni coinvolti nel meccanismo dell'infezione del virus dell'encefalite giapponese. Sulla base di studi in vivo effettuati nei topi, è stato osservato che il bortezomib, un farmaco antitumorale indicato per il mieloma multiplo e il linfoma, può ridurre la morte indotta da virus dell'encefalite giapponese nei topi, oltre che alleviare la sofferenza ed eventualmente ridurre il danno cerebrale. Questo studio evidenzia quindi un nuovo potenziale farmaco per il trattamento del virus dell'encefalite giapponese.

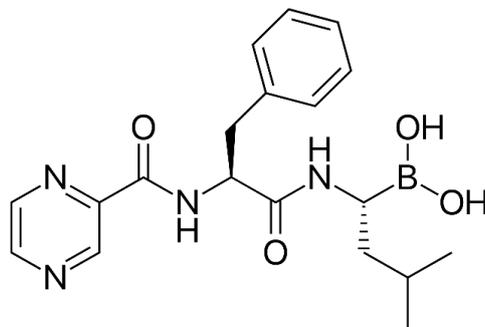


Figura 12. Struttura del bortezomib [Fonte: Wikipedia]

Un'altra malattia zoonotica molto grave e diffusa è la tubercolosi, che determina ancora nel mondo un alto indice di mortalità. L'identificazione di un farmaco nuovo ed efficace è essenziale. Passi (2018) riporta un metodo di riposizionamento molto efficace ed unico, basato sulle correlazioni di funzioni molecolari tra le coppie farmaco-bersaglio conosciute, per prevedere le interazioni farmaco-bersaglio. Questo approccio si chiama 'RepTB' e non è stato applicato molto come strategia di riposizionamento. Gli autori hanno usato il metodo Network based inference per analizzare un network basato sull'ontologia genica contenente 26.404

applicato questa stessa strategia dimostrando che essa è efficace anche per individuare farmaci contro coronavirus e altri virus influenzali

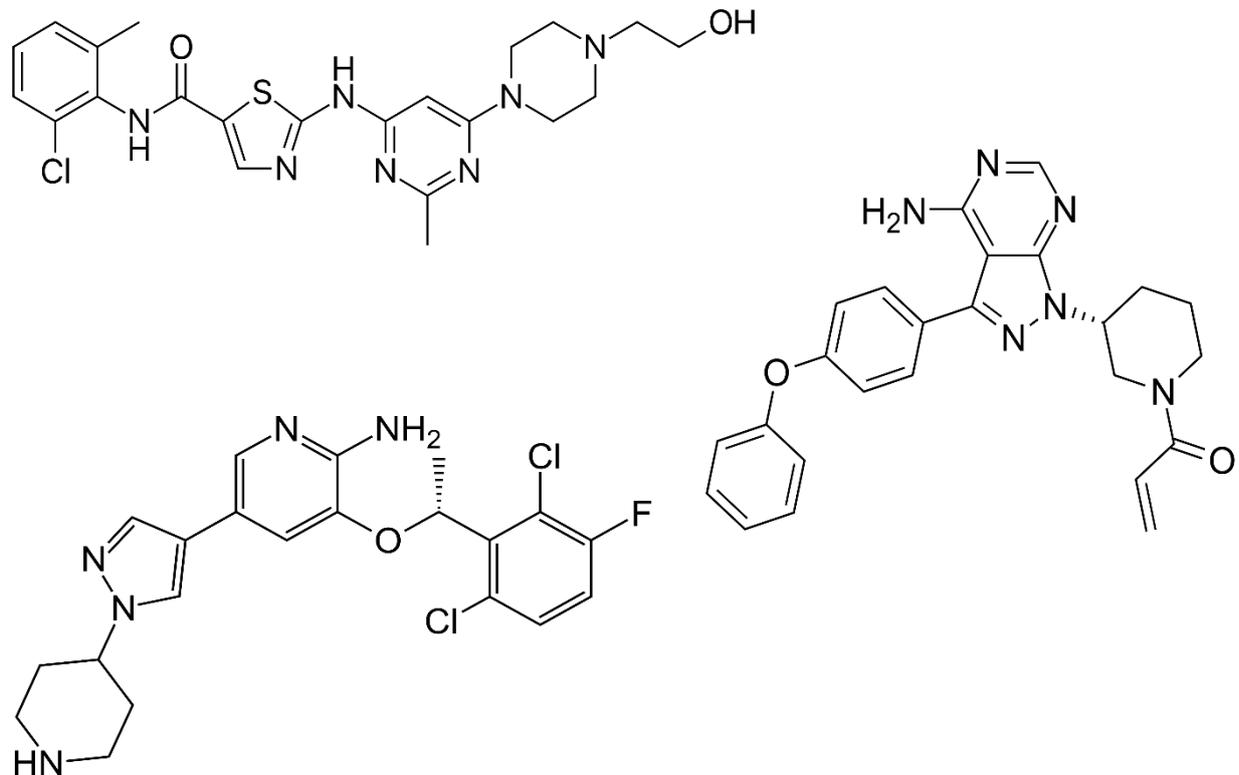


Figura 14. Struttura di dasatinib (alto sinistra), ibrutinib (destra), crizotinib (basso sinistra) [Fonte: Wikipedia]

Allo stesso modo, Oliveira (2019) ha descritto riposizionamento dell'ibuprofene, farmaco antinfiammatorio non steroideo (FANS), contro l'infezione da *Staphylococcus aureus*. Gli autori hanno usato un controllo costituito da cellule aderenti e biofilm con *S. aureus* e hanno osservato che l'ibuprofene causa riduzioni fino all'80% delle attività metaboliche cellulari e la perdita totale di culturabilità delle cellule aderenti e dei biofilm. Tuttavia, il farmaco non è risultato attivo contro ceppi resistenti agli antibiotici. Questo aspetto, indubbiamente molto interessante, richiede quindi ulteriori studi per individuare un farmaco più potente in grado di superare la resistenza agli antibiotici dell'agente patogeno. Anche i farmaci antitumorali possono essere usati contro le malattie patologiche attraverso riposizionamento. Il cisplatino è un importante farmaco antitumorale utilizzato nel trattamento di diversi tipi di tumori maligni. Yuan (2018) ha dimostrato il riposizionamento del cisplatino contro *Pseudomonas aeruginosa*. Questo studio ha confermato l'efficacia del farmaco come agente antimicrobico che esplica la sua azione tramite l'inibizione della replicazione del DNA. Anche studi in vitro e in vivo

confermano questa caratteristica. Inoltre, il farmaco è risultato in grado di bloccare il sistema di secrezione di tipo III del microbo, importante per la secrezione delle esotossine. Pic (2018) ha usato il farmaco antelmintico salicilanilide ossiclozanide contro ceppi di *Candida albicans* risultati clinicamente resistenti. Questo studio ha dimostrato che il farmaco è efficace sia in ceppi sensibili che in quelli resistenti e l'attività antimicotica della ossiclozanide è risultata potenziata quando la *C. albicans* è cresciuta in fonti di carbonio non fermentabili. Gli autori hanno ipotizzato che il meccanismo d'azione sia dovuto all'interruzione del potenziale di membrana mitocondriale.

Altre patologie

Patrick (2018) ha introdotto un approccio bioinformatico efficiente e di successo per riposizionamento dei farmaci utilizzando un "word embedding" (letteralmente immersione di parole) per estrapolare informazioni sui farmaci da più di 20 milioni di articoli, applicando metodi di machine learning sul modello farmaco-malattia. Gli autori hanno utilizzato il riposizionamento su nove malattie cutanee diverse, tra cui psoriasi, dermatite atopica, alopecia areata e altre otto malattie immuno-mediate. Si sono focalizzati sulla psoriasi, che è una condizione infiammatoria cronica della pelle e che colpisce più di 100 milioni di persone in tutto il mondo. Utilizzando questo approccio, gli autori sono stati in grado di confermare l'efficacia dei farmaci noti per il trattamento della psoriasi e contestualmente di individuare potenziali farmaci candidati per trattare altre malattie. Questo lavoro ha fornito un algoritmo efficace che può essere utilizzato per identificare i farmaci riposizionamento per le malattie

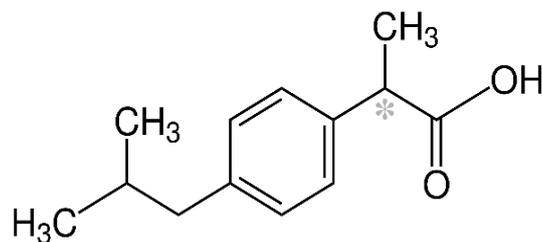


Figura 15. Struttura dell'ibuprofene [Fonte: Wikipedia]

dermatologiche su base immunitaria.

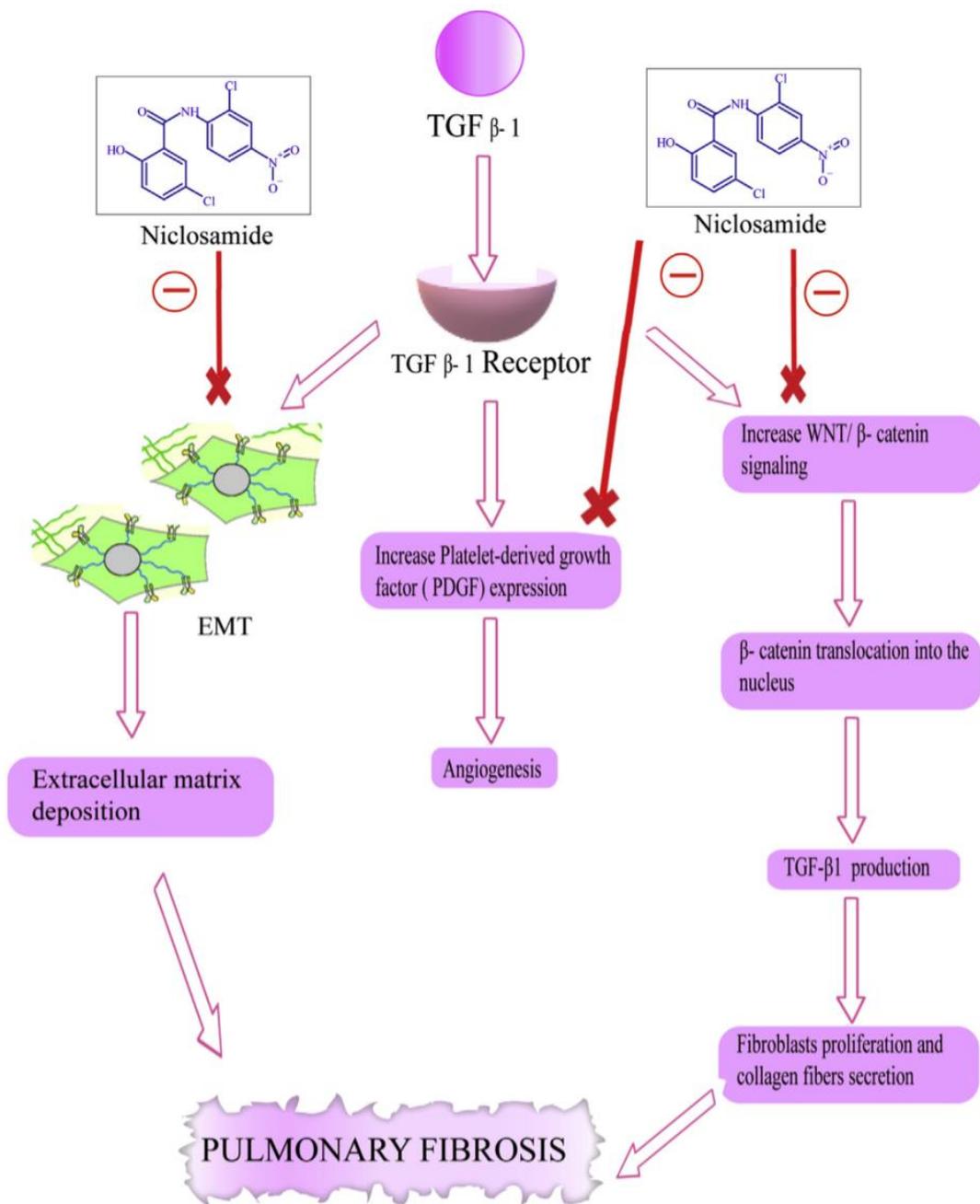


Figura 17. Struttura della niclosamide e meccanismi coinvolti nella sua attività antifibrotica.

[Fonte: Kumar R. et al. *Eur J Med Chem.* 2019;182:111602]

Fang (2018) si è incentrato su riposizionamento di farmaci per la malattia coronarica utilizzando strumenti computazionali. Gli autori hanno utilizzato approcci in silico inserendo interazioni farmaco-target noti, geni della malattia coronarica derivati da studi genetici e genomici e anche attraverso l'interattomica delle proteine umane. Questo lavoro fornisce alcuni dati interessanti basati su studi del caso di vari farmaci approvati, fasudil, parecoxib,

dexametasone e alcuni prodotti naturali come resveratrolo, luteolina, daidzeina e acido caffeico, risultati efficaci nella terapia della malattia coronarica.

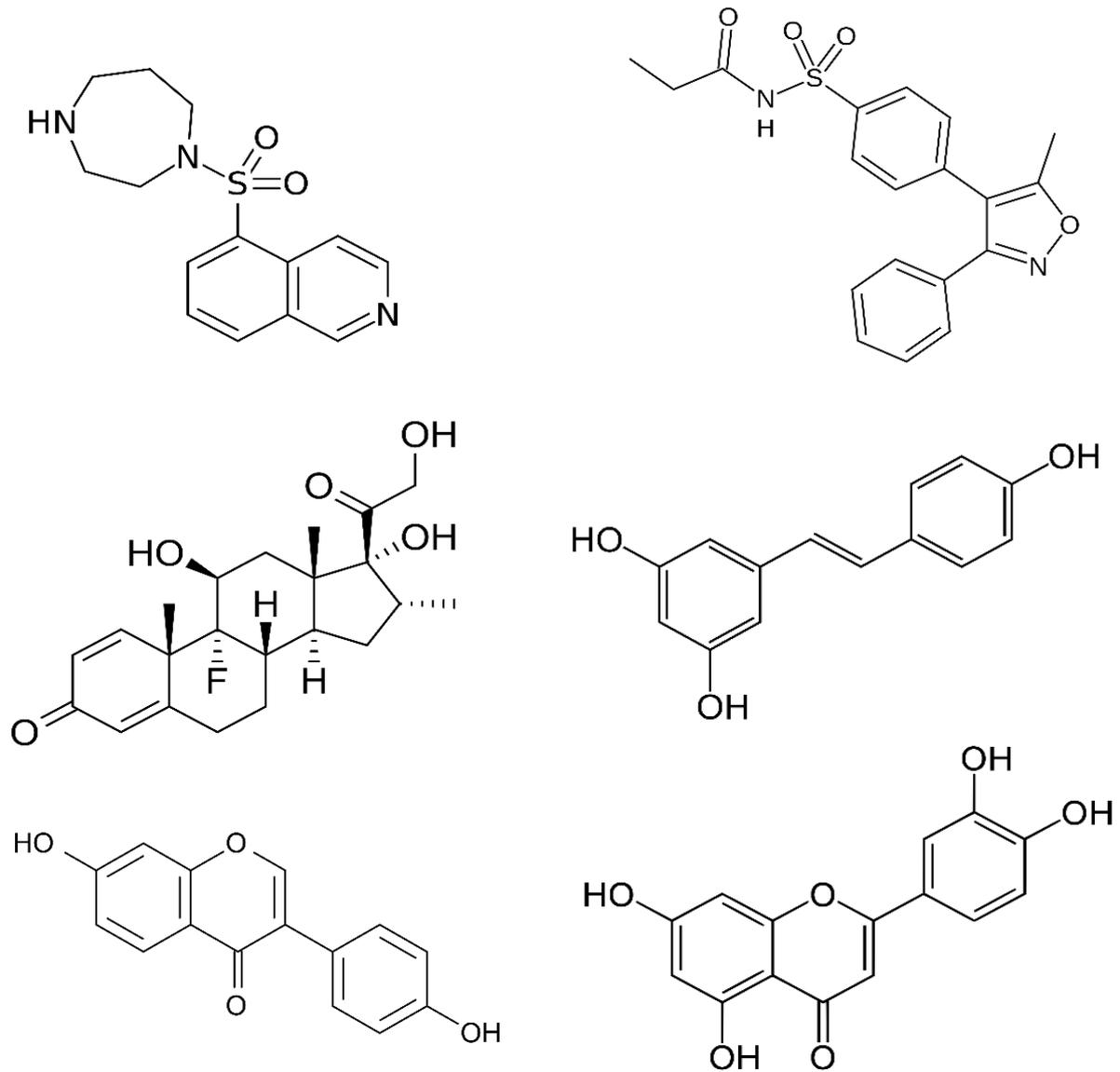


Figura 18. Strutture di fasudil (alto sinistra), parecoxib (alto destra), dexametasone (centro sinistra), resvaretrolo (centro destra), daidzeina (basso sinistra), luteolina (basso destra) [Fonte: Wikipedia]

5. Riposizionamento farmaci per Covid-19

I coronavirus sono una grande famiglia di virus a singolo filamento positivo di RNA (+ssRNA) (Perlman e Netland 2009) e vengono classificati in quattro sottofamiglie principali: alfa e betacoronavirus che infettano l'uomo e deltacoronavirus e gammacoronavirus che generalmente infettano gli uccelli. Essi sono la causa principale di infezioni e malattie respiratorie che vanno dal comune raffreddore a più gravi manifestazioni, esempio la polmonite sinciziale. La sindrome respiratoria del Medio Oriente (MERS) e la sindrome respiratoria acuta grave (SARS), associate ai coronavirus, appartengono al genere dei betacoronavirus. Un nuovo coronavirus (CoV) denominato "2019 novel coronavirus" o "2019-nCoV", "severe acute respiratory syndrome coronavirus 2", o "SARS-CoV2" ha causato la recente epidemia di polmonite denominata "coronavirus disease 2019" o "COVID-19" iniziata a dicembre 2019 nella città di Wuhan, provincia di Hubei, Cina (Wu et al. 2020) e presto diventata pandemia in tutto il mondo.

La fisiopatologia e i meccanismi di virulenza dei coronavirus sono legati alla funzione delle loro proteine strutturali e non strutturali. Le proteasi sono una delle più importanti proteine non strutturali all'interno del ciclo di replicazione virale e vengono utilizzate per produrre proteine funzionali e strutturali. La cisteina proteasi simile alla papaina (PLP2^{pro}) e la cisteina proteasi simile alla chimotripsina (3CL^{pro25-30} chiamata anche M^{pro}) sono le principali proteasi della SARS (Mukherjee et al. 2011). È interessante notare che la cisteina proteasi simile alla papaina può attenuare la risposta antivirale delle cellule ospiti (Lindner et al. 2005; Niemeyer et al. 2018). L'elicasi e l'RNA polimerasi RNA-dipendente sono le altre proteine non strutturali cruciali codificate dal genoma dei coronavirus (Zumla et al. 2016). L'elevata somiglianza tra le principali proteine della SARS e COVID-19 (Zhou et al. 2020) e la loro similarità di sequenza al 79,5% (He et al. 2020), suggerisce che un farmaco progettato per agire sulle proteine della SARS (Mukherjee et al. 2011) potrebbe essere efficace anche contro COVID-19.

Le principali proteine strutturali nei coronavirus sono costituite dalla glicoproteina spike (S) suddivisa in due sottounità S1 e S2, dalle proteine della membrana, dalle proteine dell'involucro e dalle proteine del nucleocapside (Perlman e Netland 2009). Similmente alla SARS, COVID-19 entra nelle cellule ospiti tramite il recettore dell'enzima convertitore dell'angiotensina 2 (ACE2) con un'affinità da 10 a 20 volte superiore alla SARSCoV (He et al. 2020; Suand Wu 2020).

COVID-19 si manifesta in varie forme alcune asintomatiche o paucisintomatiche altre molto più severe che possono causare necessità di supporto respiratorio e che sono caratterizzate da sepsi, shock settico e sindrome da disfunzione multiorgano. I segni e i sintomi più comuni di questa malattia sono la febbre (98%), la tosse secca (76%), la mialgia o l'affaticamento (44%), la dispnea (55%) e i sintomi meno comuni sono la produzione di espettorato (28%), il mal di testa (8%), l'emottisi (5%) e la diarrea (3%). Inoltre, tramite una tomografia computerizzata del torace può essere riscontrata la polmonite (Bassetti et al. 2020; Huang e Herrmann 2020). Le analisi di laboratorio effettuate sui pazienti hanno messo in evidenza leucopenia (25%), linfopenia (63%), trombocitopenia (5%) (Bassetti et al. 2020). Le caratteristiche cliniche del COVID-19 possono essere classificate sulla base della loro gravità nelle seguenti forme (Wu e McGoogan 2020):

1. Una malattia lieve che si è verificata nell'81% dei casi con polmonite assente o debole;
2. Malattia grave che si verifica nel 14% dei casi ed è caratterizzata da dispnea, frequenza respiratoria $\geq 30/\text{min}$, saturazione di ossigeno nel sangue $\leq 93\%$, rapporto tra la pressione parziale di ossigeno e il frazionamento di ossigeno inspirato (il rapporto tra la pressione sanguigna dell'ossigeno e la percentuale di ossigeno fornito) < 300 , infiltrazioni polmonari $> 50\%$ entro le 24-48 ore;
3. Malattia critica che si verifica nel 5% dei casi con insufficienza respiratoria, shock settico, disfunzione multiorgano.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), i Centers for Disease Control and Prevention e la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti, la gestione della COVID-19 si è concentrata principalmente sulla prevenzione delle infezioni, sull'individuazione e il monitoraggio dei casi e sulle cure di supporto. Tuttavia, non sono stati consigliati trattamenti specifici anti-COVID-19 a causa della mancanza di dati scientifici in merito. Data la gravità di questa epidemia, i ricercatori si sono particolarmente concentrati al riposizionamento di agenti antivirali approvati o in fase di sviluppo contro le infezioni causate dal virus dell'immunodeficienza umana (HIV), virus dell'epatite B (HBV), virus dell'epatite C (HCV) e influenza (Li e De Clercq 2020). Di conseguenza potrebbero venire proposte per il trattamento della COVID-19 farmaci già impiegati in terapia con un diverso target, in particolare messi a punto per trattare la MERS e SARS sulla base del fatto che queste patologie condividono con la COVID-19 una simile struttura del virus e comuni vie di infezione. (Yu et al. 2020).

Al momento della stesura di questa tesi, non è ancora disponibile alcun farmaco approvato dalla FDA per il trattamento di COVID-19. Sono stati suggeriti alcuni vecchi farmaci per gestire la pandemia, farmaci che vengono utilizzati sulla base di studi in vitro o in vivo descritti in letteratura. Sono tuttavia disponibili pochi dati clinici a supporto di questa sperimentazione. Tra questi farmaci vanno citati il remdesivir, la cloroquina e l'idrossicloroquina in combinazione con l'azitromicina, il tocilizumab, il lopinavir e il ritonavir. Nel marzo 2020, l'OMS ha avviato in 10 paesi Solidarity, un importante trial mondiale, sui quattro trattamenti verso il coronavirus più promettenti come risposta alla pandemia COVID-19. Remdesivir, cloroquina/idrossicloroquina e lopinavir/ritonavir in combinazione con l'interferone beta sono attualmente le terapie sperimentali valutate nell'ambito di questo "Solidarity Trial".

Farmaci antimalarici riposizionati contro COVID-19

Ci sono approfonditi studi che hanno dimostrato l'efficacia della cloroquina contro vari microrganismi intracellulari e la malaria, *Coxiella burnetii* e *Tropheryma whipplei* (Colson et al. 2020). La cloroquina o l'idrossicloroquina sono usate nella terapia delle malattie autoimmuni (Wang et al. 2020) e hanno un effetto benefico contro i coronavirus (Colson et al. 2020; Wang et al. 2020). La prescrizione di cloroquina ha sicuramente migliorato il decorso della polmonite nei pazienti affetti da COVID-19. Il farmaco riduce il decorso della malattia, promuove uno stadio negativo del virus e riduce la durata della degenza ospedaliera (Gao et al. 2020). Ha una buona distribuzione nei polmoni (Wang et al. 2020).

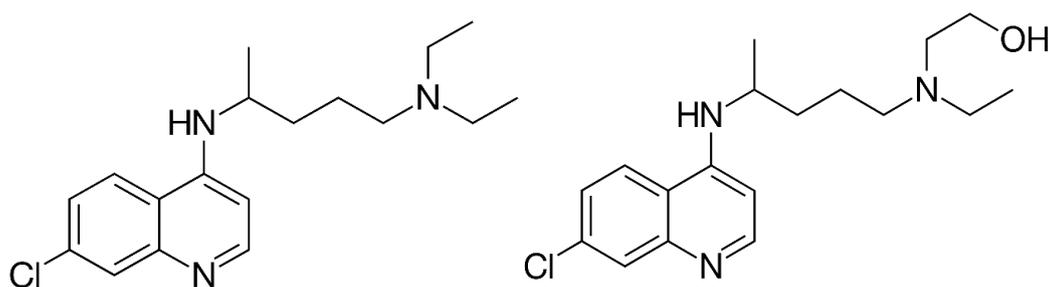


Figura 19. Strutture di cloroquina (sinistra), idrossicloroquina (destra) [Fonte: Wikipedia]

Questo farmaco alcalinizza il pH endosomico e interferisce con la fusione virus-endosoma, contrastando l'entrata o l'uscita del virus dalla cellula (Vincent et al. 2005). È stato dimostrato che una delle glicoproteine che consente al virus della SARS l'invasione della cellula ospite media l'ingresso virale attraverso l'endocitosi dipendente dal pH (Yang et al. 2004). La cloroquina inibisce la glicosilazione del recettore ACE2 sulla superficie cellulare (Vincent et al.

2005). Inoltre, determina risposte immunomodulatorie e antinfiammatorie attraverso molte vie tra cui l'inibizione dell'attività della fosfolipasi A2 e il blocco della produzione e del rilascio di citochine (Al-Bari 2015). Potrebbe quindi attraverso questi meccanismi bloccare la cascata di citochine determinata da COVID-19. È stato detto che l'attività dell'idrossiclorochina su COVID-19 è probabilmente la stessa espletata dalla cloroquina (Colson et al. 2020), tuttavia l'idrossiclorochina sembra avere un'attività antivirale più potente (Yao et al. 2020).

Poiché la cloroquina inibisce l'attaccamento e la fusione del virus alle cellule ospiti, potrebbe risultare un buon candidato per la profilassi contro le malattie virali. Alcuni studi hanno dimostrato gli effetti preventivi della cloroquina contro la SARS sia prima che dopo l'esposizione. Una profilassi pre-esposizione di 250-500 mg al giorno e post-esposizione a 8 mg/kg al giorno per 3 giorni è stata raccomandata proprio per la profilassi contro COVID-19. Tuttavia, non vi sono prove certe che dimostrino l'efficacia della cloroquina nella profilassi contro COVID-19 (Chang 2020), ed è stato ipotizzato che l'uso profilattico della cloroquina possa compromettere la risposta del sistema immunitario innato contro questa infezione (Soraya 2020).

L'intervallo QT è l'elemento più importante nella valutazione della tossicità della cloroquina in COVID-19. Il farmaco può causare diversi effetti collaterali quali: problemi cardiovascolari e dermatologici, l'esacerbazione della porfiria, ipoglicemia grave, crampi addominali, anoressia, diarrea, nausea e vomito e problemi endocrini, metabolici e gastrointestinali. La cloroquina può causare anomalie ematologiche e immunologiche, può aumentare gli enzimi epatici e indurre reazioni di ipersensibilità. Inoltre, altri effetti collaterali segnalati sono a carico del sistema nervoso, esempio difficoltà neuromuscolari, scheletriche, oftalmiche e ottiche. Infine, questo farmaco deve essere usato con cautela nei pazienti con preesistenti danni uditivi, deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD), insufficienza epatica, porfiria, psoriasi e disturbi epilettici. Poiché la cloroquina è il substrato del CYP2D6 e del CYP3A4, il rischio di interazioni farmacologiche potenzialmente dannose deve essere considerato nelle terapie in combinazione.

Farmaci antielmintici e antiprotozoari riposizionati contro COVID-19

La niclosamide, un vecchio farmaco antielmintico, è stato riportato avere attività antivirale ad ampio spettro contro SARS, MERS, virus Zika, virus dell'encefalite giapponese, virus dell'epatite C, virus Ebola, rinovirus umano, virus chikungunya, adenovirus umano e virus Epstein-Barr (Xu et al. 2020). Wu et al. (2004) hanno effettuato uno studio riportando che la niclosamide è stata in grado di inibire la replicazione della SARS (Wu et al. 2004). Questo farmaco stimola l'autofagia nel MERS-CoV, riducendo la replicazione virale (Gassen et al. 2019). La nitazoxanide è un secondo farmaco antiparassitario approvato dalla FDA per il trattamento di *Cryptosporidium* e *Giardia* che potrebbe utilizzato nella terapia della COVID-19. Alcuni studi hanno menzionato la sua attività antivirale ad ampio spettro (Rossignol 2014). Questo farmaco è stato suggerito come efficace contro le infezioni da coronavirus (Cao et al. 2015). Inoltre, la nitazoxanide è stata proposta come un farmaco innovativo per il trattamento della MERS (Rossignol 2016). Nelle cellule infettate da un RNA esterno, la nitazoxanide amplifica le risposte immunitarie antivirali innate dell'ospite, innescando il rilevamento dell'RNA citoplasmatico estraneo e l'asse dell'interferone di tipo 1 (Jasenovsky et al. 2019). Grazie a queste proprietà la nitazoxanide può presentare delle potenzialità nella terapia contro COVID-19 (Adnan Shereen et al. 2020). Gli effetti collaterali più comuni segnalati da più del 2% dei pazienti che hanno ricevuto il farmaco sono stati mal di testa, dolori addominali, nausea e decolorazione delle urine.

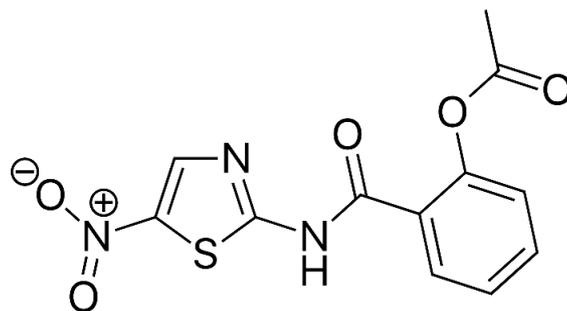


Figura 20. Struttura della nitazoxanide [Fonte: Wikipedia]

Farmaci antivirali riposizionati contro COVID-19

Sulla base di diversi studi è stato rivelato che la combinazione lopinavir/ritonavir come tale o in combinazione con altri antivirali riduce l'incidenza e la mortalità della sindrome da stress respiratorio acuto correlata alla SARS e alla MERS (Chu et al. 2004). L'associazione lopinavir/ritonavir inibisce la proteasi dell'HIV determinata dal cleavage proteico e produce particelle virali non infettive e immature (Guo et al. 2020). Questa terapia è stata anche raccomandata contro la polmonite da COVID-19, ma sembra avere poco o nessun effetto (Cao et al. 2020). L'efficacia dell'associazione3 lopinavir/ritonavir contro gli enzimi proteasici della COVID-19 non è sicura per due motivi: le proteasi HIV appartengono alla famiglia delle proteasi aspartiche, mentre le proteasi coronavirus appartengono alla famiglia delle proteasi cisteiniche; il dimero delle proteasi HIV viene inibito in una tasca simmetrica C2, presente nel sito catalitico, che risulta assente nelle proteasi coronavirus.

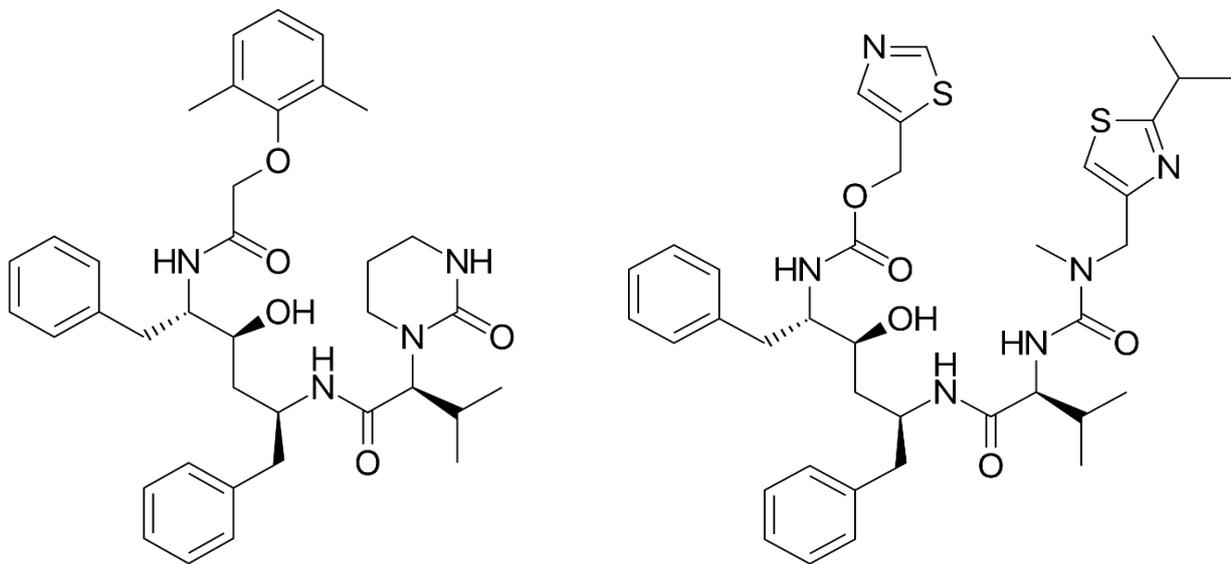


Figura 21. Struttura del lopinavir (sinistra), ritonavir (destra) [Fonte: Wikipedia]

Gli effetti collaterali più importanti segnalati in più del 10% dei pazienti che hanno ricevuto l'associazione lopinavir/ritonavir sono risultati essere eruzione cutanea, dislipidemia, diarrea, vomito, nausea, dolori addominali, aumento degli enzimi epatici e infezioni delle vie respiratorie. Inoltre, questa associazione può alterare la conduzione cardiovascolare. Il lopinavir subisce un metabolismo esteso attraverso gli isoenzimi epatici del CYP3A. Un'eventuale co-somministrazione con induttori del CYP3A diminuisce il suo livello. Il ritonavir

è un potente inibitore del CYP3A e la co-somministrazione di farmaci che vengono metabolizzati con questo enzima aumenta la loro concentrazione plasmatica.

L'RNA polimerasi RNA-dipendente è un enzima importante nel ciclo di vita dei virus a RNA, tra cui il coronavirus, il virus dell'epatite C e il virus Zika. Questo enzima è il bersaglio di alcuni farmaci antivirali. Sofosbuvir e ribavirina fanno parte della classe degli analoghi dei nucleotidi. Essi inibiscono la RNA polimerasi RNA-dipendente e sono utilizzati nella terapia del virus dell'epatite C. IDX-184 è un altro farmaco inibitore dell'RNA polimerasi RNA-dipendente che è in fase di sperimentazione clinica per la terapia del virus dell'epatite C. Un recente studio in silico di Elfiky ha dimostrato l'efficacia del remdesivir contro l'RNA polimerasi RNA-dipendente della COVID-19. Il remdesivir è un nuovo farmaco antivirale che è stato sviluppato contro il virus Ebola non solo per il trattamento ma anche per la profilassi post-esposizione. In vitro ha mostrato un'attività antivirale ad ampio spettro contro filovirus, areavirus e coronavirus (Warren et al. 2016). Il remdesivir è metabolizzato in un analogo dell'adenosina che interferisce con l'azione dei virus a RNA polimerasi in seguito all'ingresso del virus nell'ospite. Sembra avere buoni effetti inibitori contro il COVID-19 a livello cellulare (Guo et al. 2020). In un report, il remdesivir è stato iniettato per via endovenosa in un paziente con COVID-19 senza effetti collaterali (Holshue et al. 2020). L'uso di remdesivir può determinare nausea, vomito, prolungato tempo di protrombina e aumento degli enzimi epatici.

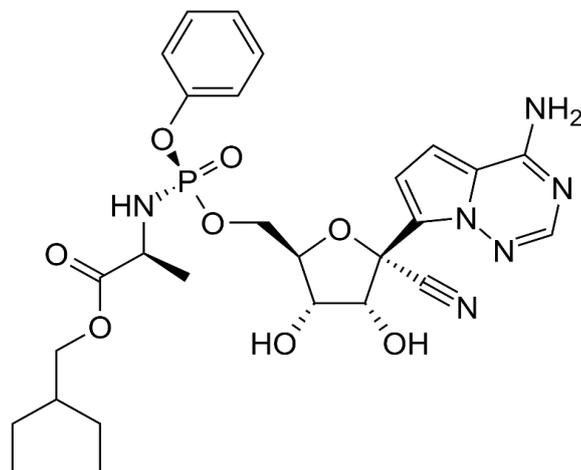


Figura 22. Struttura del remdesivir [Fonte: Wikipedia]

Il favipiravir è un farmaco che viene metabolizzato in un analogo nucleosidico e inibisce l'RNA polimerasi RNA-dipendente virale (Furuta et al. 2017) di virus quali l'influenza, ebola, febbre gialla, chikungunya, norovirus, enterovirus e COVID-19. In Giappone questo farmaco è

approvato per la terapia dell'influenza (De Clercq 2019). Nel febbraio 2020, esso è stato testato in Cina in studi randomizzati per trattare la COVID-19 (Li e De Clercq 2020).

Le terapie farmacologiche utilizzate contro l'influenza, compresi gli inibitori della neuraminidasi (oseltamivir, peramivir, zanamivir), farmaci come il ganciclovir, l'aciclovir e la ribavirina, così come il metilprednisolone che inizialmente sono stati utilizzati per il trattamento della COVID-19, a tutt'oggi non sono risultati essere efficaci (Guo et al. 2020).

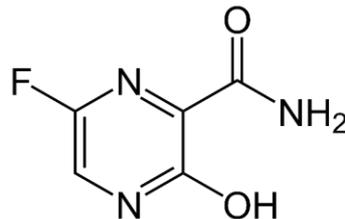


Figura 23. Struttura del favipiravir [Fonte: Wikipedia]

Antibatterici riposizionati contro COVID-19

Anche se l'uso di antibiotici, specialmente quelli ad ampio spettro, dovrebbe essere evitato nei pazienti con COVID-19, nel caso fosse presente un'infezione batterica, si raccomanda l'utilizzo di agenti antibatterici (Jin et al. 2020). Gli agenti antimicrobici somministrati contro la polmonite sono amoxicillina, azitromicina o fluorochinoloni. La moxifloxacina è l'antibatterico di prima scelta in caso di infezioni da micoplasma o clamidia (Zhang et al. 2020). L'azitromicina, un macrolide, è l'antimicrobico più raccomandato e in caso di COVID-19 è stato associato a idrossiclorochina, in quanto induce un effetto sinergico per l'eliminazione del virus. Questa terapia combinata (azitromicina 500 mg il primo giorno, seguita da 250 mg al giorno, i successivi 4 giorni, e solfato di idrossiclorochina 200 mg, tre volte al giorno per 10 giorni) ha ridotto il numero di contagi e diffusione virale (Gautret et al. 2020). L'azitromicina è un antibiotico del gruppo dei macrolidi che ha effetti antinfiammatori (Amsden 2005; Beigelman et al. 2009; Ivetić Tkalčević et al. 2006). Inoltre, ha proprietà antivirali (Iannetta et al. 2017; Menzel et al. 2016; Schoegler et al. 2014; Schögler et al. 2014). Questo può essere un motivo per cui l'associazione di questo farmaco con idrossiclorochina ha migliorato il recupero del paziente affetto da COVID-19. A questo proposito, sarà necessario testare l'azitromicina come terapia di prima scelta per il COVID-19. Si dovrà tenere presente però che sia l'associazione cloroquina/idrossiclorochina (Silva et al. 2007) che l'azitromicina (Hancox et al. 2013) sono ben noti per la loro capacità di prolungare l'intervallo QTc, questa terapia combinata quindi potrà

aumentare il rischio di effetti collaterali a livello cardiaco, risultando quindi sconsigliata in tutti i pazienti cardiopatici.

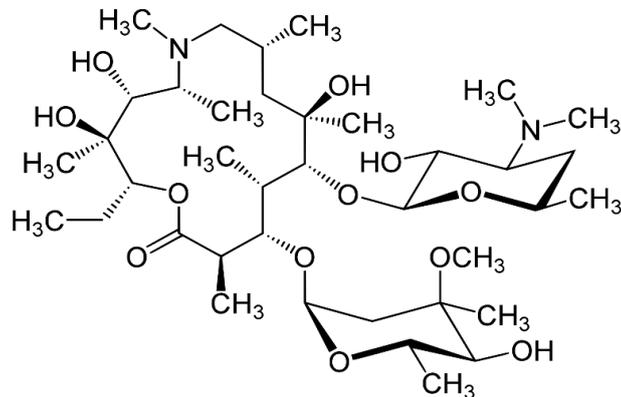


Figura 24. Struttura dell'azitromicina [Fonte: Wikipedia]

Inibitori delle chinasi e della cascata di citochine ripositionati contro COVID-19

Come accennato precedentemente, ACE2 è una proteina della superficie cellulare espressa sul polmone dalle cellule epiteliali alveolari AT2 e ha un ruolo molto importante nell'endocitosi e l'ingresso del virus della COVID-19 nelle cellule. Ap2-associata alla proteina chinasi 1 è uno dei principali promotori dell'endocitosi mediata da clatrina. La sua inibizione può disturbare la penetrazione del virus nelle cellule e l'assemblaggio delle sue particelle. La Janus chinasi (JAK) è l'altro mediatore del passaggio del virus nelle cellule polmonari. È stato proposto che il baricitinib (2 o 4 mg una volta al giorno), inibendo queste chinasi, possa essere utile nella malattia respiratoria acuta COVID-19. Questo farmaco ha una doppia funzione in quanto blocca l'ingresso del virus e contestualmente inibisce il rilascio di citochine sulla via di segnalazione JAK-STAT e di conseguenza inibisce l'infiammazione (Richardson et al. 2020). Tofacitinib, baricitinib, fedratinib e ruxolitinib sono tutti inibitori della via di segnalazione JAK-STAT e sono antinfiammatori di ultima generazione; tuttavia, il baricitinib è risultato migliore del fedratinib e del ruxolitinib grazie alla sua elevata attività per la proteina chinasi 1 associata all'Ap2. Una sola somministrazione al giorno e a effetti collaterali accettabili è risultata valida nella terapia della COVID-19 (Richardson et al. 2020).

Gli effetti collaterali descritti derivanti dall'assunzione di baricitinib sono stati infezioni delle vie respiratorie superiori per più del 10% dei pazienti, nausea, aumento degli enzimi epatici, dislipidemia, anemia, trombosi, linfocitopenia e aumento della creatinina sierica. Il baricitinib non dovrebbe essere usato in combinazione con forti immunosoppressori, tra cui azatioprina o ciclosporina, altri inibitori JAK e altri farmaci antireumatici biologici che modificano la malattia.

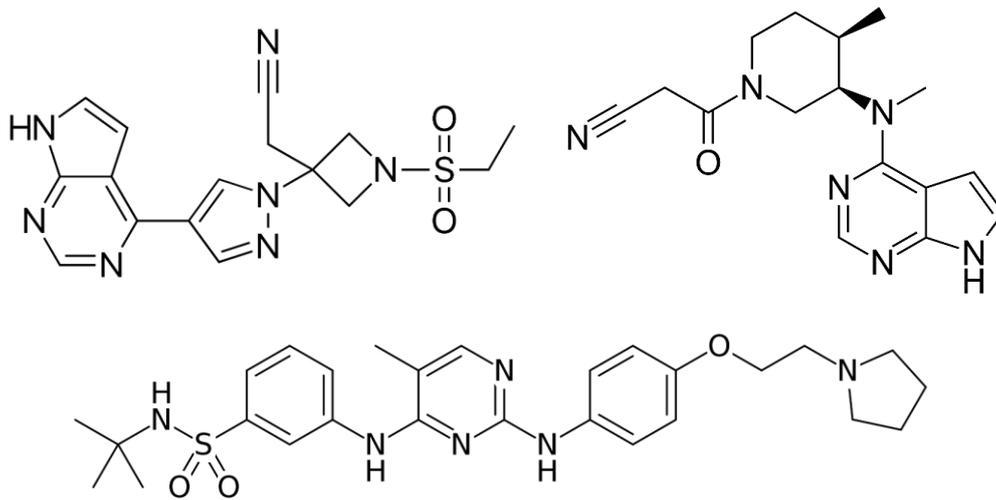


Figura 25. Struttura di baricitinib (alto sinistra), tofacitinib (alto destra), fedratinib (basso) [Fonte: Wikipedia]

Nei pazienti più gravi, l'infezione da COVID-19 si manifesta con un notevolissimo rilascio di citochine, che determina un aumento delle concentrazioni plasmatiche delle interleuchine 2, 7 e 10, del fattore di crescita stimolante la formazione di colonie granulocitiche, dell'interferone- γ inducibile, della chemokina 2, della proteina infiammatoria dei macrofagi e del fattore di necrosi tumorale α (TNF- α). In coloro che sopravvivono alla terapia intensiva, queste risposte immunitarie aberranti ed eccessive portano a importanti danni polmonari e fibrosi a lungo termine, causando disabilità funzionali e riducendo la qualità della vita (Zumla et al. 2020).

Alcuni farmaci sono risultati in grado di mitigare gli effetti suscitati dalle citochine rilasciate in risposta al COVID-19 e a limitare i danni polmonari nei pazienti più gravemente colpiti. Tra questi farmaci vanno citati il siltuximab, un anticorpo monoclonale contro l'interleuchina-6 approvato per la malattia multicentrica di Castleman (Gritti et al. 2020), un farmaco antireumatico come il tocilizumab, un anticorpo monoclonale contro l'interleuchina-6 (Zhang et al. 2020), il sarilumab, un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato specifico per

l'IL-6 (Singh et al. 2020) e anakinra, un antagonista umano ricombinante del recettore dell'interleuchina-1 (Mehta et al. 2020).

Gli effetti collaterali più comuni nei pazienti che hanno assunto il siltuximab sono edema, prurito, eruzione cutanea, aumento di peso, iperuricemia e infezione delle vie respiratorie superiori sono. Altri effetti collaterali che sono stati riportati sono ipotensione, cefalea, dislipidemia, reazioni dermatologiche, costipazione, trombocitopenia, reazioni di ipersensibilità e insufficienza renale. Gli effetti collaterali in più del 10% dei pazienti trattati con tocilizumab sono dislipidemia, aumento degli enzimi epatici, reazione del sito di iniezione, invece meno frequentemente problemi cardiovascolari, gastrointestinali, renali, oftalmici, dermatologici, endocrini e metabolici. I pazienti trattati con sarilumab hanno manifestato più comunemente un aumento degli enzimi epatici, altri effetti collaterali sono stati prurito del sito di iniezione, ipertrigliceridemia e anomalia ematologica. Gli effetti collaterali in più del 10% dei pazienti trattati con anakinra sono stati mal di testa, vomito, sviluppo di anticorpi,

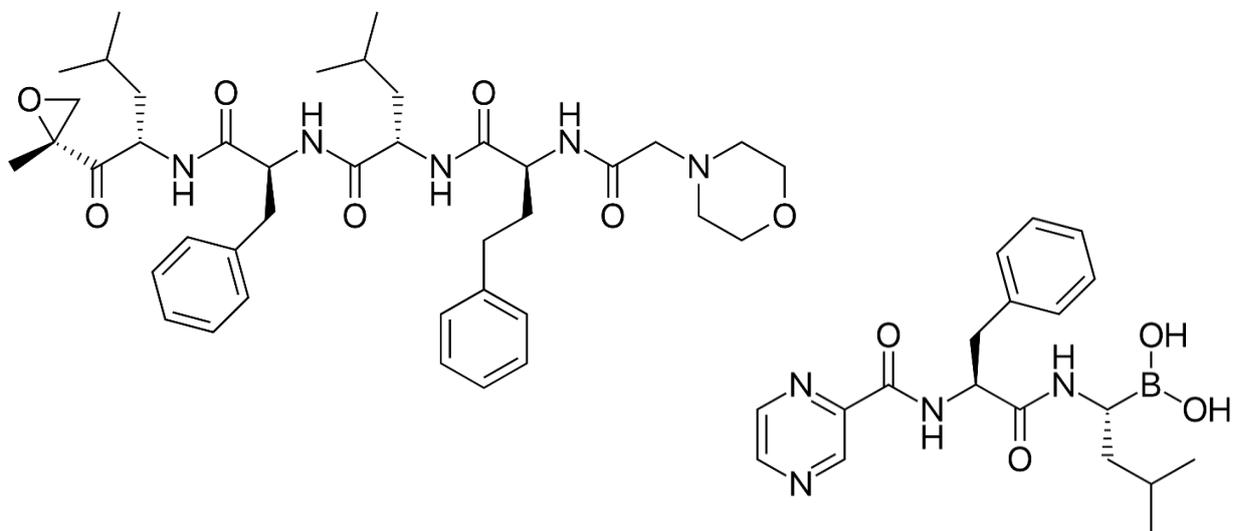


Figura 26. Struttura di carfilzomib (alto), bortezomib (basso) [Fonte: Wikipedia]

infezione, reazione del sito di iniezione, artralgia, rinofaringite e febbre. In generale questi pazienti sono maggiormente a rischio di sviluppare infezioni gravi che possono portare al ricovero ospedaliero o alla morte.

Agenti antineoplastici

Carfilzomib, bortezomib (Jin et al. 2020), imatinib (Ge et al. 2020), e carrizumab (Zhang et al. 2020a) sono i farmaci antineoplastici che sono stati proposti per la terapia della COVID-19. Le chinasi Abl sono chinasi tirosiniche non recettoriali che vengono espresse nel citoplasma, nel nucleo e nei mitocondri. È stato dimostrato che Abl2 è importante per l'ingresso della SARS-CoV nella cellula e gli inibitori delle chinasi Abl impediscono la formazione di sinciziale da parte della proteina S e bloccano la fusione del coronavirus con la cellula ospite (Sisk et al. 2018). In questo contesto, imatinib, un inibitore della chinasi di fusione Abl, è stato messo in evidenza come nuovo candidato nella terapia COVID-19 (Ge et al. 2020).

Il carrizumab è stato proposto per il trattamento della polmonite grave con linfocitopenia causata da coronavirus. Si tratta di un farmaco antitumorale che inibisce la proteina programmata 1 di morte delle cellule (PD-L1) (Zhangetal. 2020). Gli inibitori PD-L1 attivano il sistema immunitario (Syn et al. 2017). Il carfilzomib, il bortezomib e l'imatinib sono considerati farmaci dotati di notevole tossicità, gli effetti collaterali più comuni di questi farmaci sono nausea, vomito, stanchezza, brividi, mal di testa, dispnea, tosse, febbre, diarrea, anoressia, dolore addominale, crampi muscolari, artralgia, mialgia, ipertensione, neuropatia periferica, trombocitopenia, edema periferico, anomalie ematologiche e aumento della creatinina sierica.

6. Conclusioni

Il riposizionamento farmaci sta quindi sempre più affermandosi sia nell'industria che in università o enti governativi come un metodo affidabile e veloce per identificare farmaci adatti alla terapia di malattie rare o di malattie caratterizzate da una scarsa conoscenza delle molecole bersaglio.

Questa tecnica consente di risparmiare non solo notevoli risorse economiche ma anche tempo prezioso da investire nelle cure.

Il riposizionamento di farmaci si appresta quindi a diventare una strategia consolidata nel settore farmaceutico.

7. Bibliografia

Quanto riportato nella presente tesi è stato autonomamente rielaborato utilizzando i seguenti articoli scientifici:

-Kumar R, Harilal S, Gupta SV, Jose J, Parambi DGT, Uddin MS, Shah MA, Mathew B. Exploring the new horizons of drug repurposing: A vital tool for turning hard work into smart work. *Eur J Med Chem.* 2019;182:111602.

doi:10.1016/j.ejmech.2019.111602

-Polamreddy P, Gattu N. The drug repurposing landscape from 2012 to 2017: evolution, challenges, and possible solutions. *Drug Discov Today.* 2019;24(3):789-795.

doi:10.1016/j.drudis.2018.11.022

-Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Guilliams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseuau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1):41-58.

doi:10.1038/nrd.2018.168

-Park K. A review of computational drug repurposing. *Transl Clin Pharmacol.* 2019;27(2):59-63.

doi:10.12793/tcp.2019.27.2.59

-Masoudi-Sobhanzadeh Y, Omid Y, Amanlou M, Masoudi-Nejad A. Drug databases and their contributions to drug repurposing. *Genomics.* 2020;112(2):1087-1095.

doi:10.1016/j.ygeno.2019.06.021

-Rameshrad M, Ghafoori M, Mohammadpour AH, Nayeri MJD, Hosseinzadeh H. A comprehensive review on drug repositioning against coronavirus disease 2019 (COVID19). *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(7):1137-1152.

doi:10.1007/s00210-020-01901-6